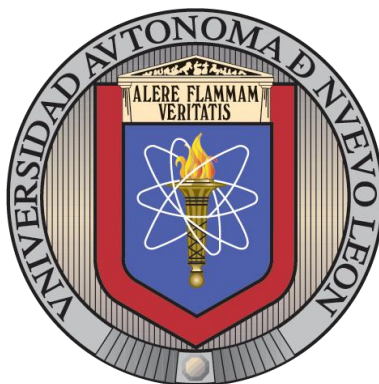


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



**RELACIÓN ENTRE AFLPs Y LA RESISTENCIA A FLUCONAZOL ENTRE
DIFERENTES CEPAS DE *Candida albicans* AISLADAS DE MUESTRAS
CLÍNICAS**

Por:

CARLOS AGUIRRE MARTINEZ

**Como requisito parcial para obtener el grado de
MAESTRO EN CIENCIAS con especialidad en Microbiología**

Noviembre, 2010

**RELACIÓN ENTRE AFLPs Y LA RESISTENCIA A FLUCONAZOL ENTRE
DIFERENTES CEPAS DE *Candida albicans* AISLADAS DE MUESTRAS
CLÍNICAS**

Comité de Tesis

Dra. Elva Teresa Aréchiga Carvajal
Director
(Asesor interno)

Dra. Gloria María González González
Director
(Asesor externo)

Dra. Susana Favela Lara
Secretario

M.C. Juan Manuel Adame Rodríguez
Vocal

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a la Dra. Elva Teresa Aréchiga Carvajal por todo su apoyo en la realización de éste proyecto y por ser la asesora del mismo. Así como a la Dra. Gloria María González González por ser mi asesora externa y proporcionarme el material biológico para la investigación.

Al M.C. Juan Manuel Adame Rodríguez por haberme permitido trabajar en su laboratorio, por su confianza y apoyo durante todo el posgrado. Al M.C. Gerardo Ramos Alfano por sus invaluable sugerencias en la elaboración del trabajo.

A la Dra. Susana Favela Lara por formar parte del Comité de Tesis. Así mismo a la Dra. Adriana Gutiérrez Díez de la Facultad de Agronomía de la UANL por permitirme el uso de su equipo y realizar parte del proyecto en su laboratorio.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo económico para la realización de mis estudios.

A mi familia por todo el apoyo que siempre me han brindado. A Aida García por estar siempre conmigo.

A mis compañeros Efrén, Raúl, Lalo, Patricio, Gaby, Manuel y Mili por todas las experiencias compartidas.

TABLA DE CONTENIDO

Sección	Página
1. RESUMEN.....	1
2. ABSTRACT	2
3. INTRODUCCIÓN	3
4. HIPÓTESIS.....	5
5. OBJETIVOS	6
5.1 Objetivo General	6
5.2 Objetivos Específicos.....	6
6. ANTECEDENTES.....	7
6.1 Género <i>Candida</i>	7
6.1.1 <i>Candida albicans</i>	7
6.1.2 Especies de <i>Candida</i> no- <i>albicans</i>	8
6.2 Factores moleculares que generan resistencia.....	10
6.3 Factores de Virulencia.....	13
6.3.1 Adherencia	13
6.3.2 Dimorfismo	14
6.3.3 Plasticidad metabólica	14
6.4 Epidemiología	15
6.5 Técnicas de detección de resistencia.....	18
6.6 Tratamiento. Azoles	19
6.7 Análisis genotípico.....	20
7. MÉTODOS	22
7.1 Cepas de <i>C. albicans</i>	22
7.2 Caracterización de susceptibilidad a fluconazol de los aislados de <i>C. albicans</i>	22
7.3 Extracción de ADN de los aislados de <i>C. albicans</i>	23
7.4 Cuantificación de ADN.....	23
7.5 Análisis de Polimorfismos de Longitud de Fragmentos Amplificados	

(AFLP)	23
7.6 Análisis estadístico de los datos de AFLPs	24
8. RESULTADOS	25
8.1 Cepas de <i>C. albicans</i>	25
8.2 Susceptibilidad a fluconazol de los aislados mediante la técnica de Drop Test	26
8.3 Extracción de ADN genómico total	31
8.3.1 Estandarización de la técnica	31
8.3.2 Cuantificación de ADN	31
8.3.3 Control de calidad de moldes de ADN	33
8.4 Análisis de polimorfismos de aislados de <i>C. albicans</i> mediante AFLP	33
8.5 Elaboración del dendograma	36
9. DISCUSIÓN	39
10. CONCLUSIÓN	42
11. LITERATURA CITADA	43

LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
1. Detalles de los aislados de <i>C. albicans</i> usados en el estudio	25
2. Clasificación de crecimiento de las 94 muestras de acuerdo a la técnica de Drop Test.....	28
3. Determinación de la concentración de ADN en ng/μl de las muestras CA1 a la CA11	32
4. Verificación de moldes de ADN tomados al azar a una concentración promedio de 20 ng/μl	32
5. Secuencias de los adaptadores y oligonucleótidos usados en el estudio	34

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Esquema de mecanismos reportados de resistencia a azoles	11
2. Frecuencia de aislamientos de <i>Candida</i> en pacientes hospitalizados del programa de vigilancia antimicrobiana SENTRY	16
3. Resultados de Drop Test de las cepas CA76, CA85, CA86, CA91, a las concentraciones de 10^6 , 10^5 , 10^4 y 10^3	27
4. Electroforesis de ADN extraído de levaduras en gel de agarosa al 1.2% teñido con bromuro de etidio.....	31
5. Tinción con bromuro de etidio de cepas de <i>C. albicans</i> con una concentración establecida de 20 ng/μl en gel de agarosa al 1.2%	33
6. Perfiles de AFLP obtenidos a partir de 90 aislados clínicos de <i>C. albicans</i> y 4 cepas de referencia	36
7. Dendograma de los 94 aislados clínicos de <i>C. albicans</i> del hospital universitario	37

NOMENCLATURA

A	Adenina
ABC	Transportadores tipo cassette de unión a ATP
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AFLP	Polimorfismos de longitud de fragmentos amplificados
ALS	Familia de proteínas tipo alfa aglutininas
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ATCC	Colección de cepas de cultivo americanas
ATP	Adenosin trifosfato
C	Citosina
CA	<i>Candida albicans</i>
CDR1	Gen que codifica una proteína de bomba de flujo multidrogas 1
CDR2	Gen que codifica una proteína de bomba de flujo multidrogas 2
Cdr1p	Proteína Cdr1
cel/ml	células por mililitro
CgSNQ2	Transportador tipo cassette de unión a ATP de <i>C. glabrata</i>
CLSI	Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio
CMI	Concentración mínima inhibitoria
dNTP	Desoxirribonucleótido trifosfato
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
ERG1	Gen que codifica la enzima escualeno epoxidasa
ERG2	Gen que codifica la enzima esterol isomerasa
ERG11	Gen que codifica la enzima lanosterol 14 α -demetilasa
Erg3p	Enzima esterol desaturasa
Flu1p	Proteína mediadora del flujo de azoles
G	Guanina
GC	Guanina citosina
h	Horas
HCl	Ácido clorhídrico
Hwp1	Proteína de superficie de <i>C. albicans</i>
kb	Kilobases
KCl	Cloruro de potasio
LCR	Líquido cefalorraquídeo
LIP1	Gen que codifica para una lipasa
Mb	Megabases
MDR1	Gen que codifica una proteína de resistencia a multidrogas
Mdr1p	Proteína Mdr1
MFS	Familia de transportadores de membrana

MgCl ₂	Cloruro de Magnesio
min	Minutos
ml	Mililitros
mM	Milimoles
MRR1	Gen que codifica un factor de transcripción
Mrr1p	Factor de transcripción que controla la expresión de MDR1
M27-A3	Método de referencia para susceptibilidad a antifúngicos de dilución en caldo para levaduras
M44-A2	Método para susceptibilidad a antifúngicos de difusión en disco para levaduras
NaCl	Cloruro de Sodio
OMS	Organización Mundial de la Salud
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
Pdr1p	Factor de transcripción de dedos de zinc
pH	Potencial de hidrógeno
P-450	Citocromo perteneciente a una familia de hemoproteínas
RPMI 1640	Medio usado para cultivos celulares
SAP	Familia de aspartil proteinasas de secreción
Sap2p	Proteinasa Sap2
SC5314	Cepa susceptible de <i>C. albicans</i>
SDD	Susceptible dependiente de dosis
SDS	Dodecilsulfato sódico
SIDA	Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida
spp	Abreviatura para especies
STES	Buffer de extracción Tris-EDTA-SDS-NaCl
T	Timina
Tac1p	Factor de transcripción de dedos de zinc
TE	Buffer Tris-EDTA
U	Unidades de actividad enzimática
UANL	Universidad Autónoma de Nuevo León
UCI	Unidad de cuidados intensivos
UPC2	Gen que codifica un factor de transcripción
Upc2p	Factor de transcripción de dedos de zinc
VIH	Virus de Inmunodeficiencia Humana
YPD	Agar dextrosa-peptona-levadura
µg	Microgramos
µg/ml	Microgramo/mililitro
µl	Microlitros
°C	Grados Celsius
%	Por ciento (medida de cantidad)

1. RESUMEN

En los últimos años, la morbilidad y mortalidad de micosis cuyo agente causal ha sido identificado como *Candida albicans* han aumentado, se cree que esto esta en estrecha relación con la sobrevida lograda en grupos vulnerables de pacientes a través del avance en la medicina. Así mismo, se ha observado una predominancia de infecciones provocadas por cepas resistentes a diferentes antifúngicos probablemente seleccionadas a través de su uso indiscriminado. La industria farmacéutica ha desarrollado en los últimos diez años nuevos compuestos buscando controlar las infecciones de *C. albicans*, con resultados más o menos alentadores. Más allá del desarrollo de nuevos fármacos, es importante conocer a nivel de ADN las características de las cepas que se encuentran circulando, ya que estas mismas nos permiten ayudar a determinar a corto plazo cuáles son los factores genéticos que contribuyen a la resistencia-sensibilidad a ciertos compuestos antifúngicos. Por lo anterior, el presente trabajo tiene por objetivo analizar mediante los Polimorfismos de Longitud de Fragmentos Amplificados (AFLP's) cual es la variabilidad genética entre cepas de *Candida albicans* sensibles y resistentes al fluconazol aisladas del Hospital Universitario "José Eleuterio González" en la ciudad de Monterrey.

2. ABSTRACT

In recent years the morbidity and mortality of fungal infections whose causative agent was identified as *Candida albicans* have increased, it's believed that this is closely related with the survival achieved in vulnerable patients with the advance of medicine. Also, it has been observed a predominance of infections caused by resistant strains to different antifungals probably selected through its indiscriminate use. The pharmaceutical industry had developed in the last ten years new compounds searching to control the infections of *C. albicans*, with more or less encouraging results. Beyond of the development of new drugs, it is important to know at DNA level the characteristics in the strains that are circulating, as they allow us to help to determinate at short term which are the genetic factors that contribute to the resistance-susceptibility to certain antifungals. Therefore, the present research aims to analyze through the Amplified Fragment Length Polymorphisms (AFLP's) which is the genetic variability among *Candida albicans* strains sensitive and resistant to fluconazole isolated from the Hospital Universitario "Jose Eleuterio González" in the city of Monterrey.

3. INTRODUCCIÓN

En los últimos años, según datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS) el caso de micosis sistémicas ha aumentado en morbilidad y mortalidad, tanto por resistencia a los antifúngicos por su uso indiscriminado, así como por emergencia de patógenos antes poco convencionales. En los años 90's, muchos pacientes infectados con el Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH) recibieron bajas dosis de terapia antifúngica durante largos períodos de tiempo lo cual resultó en aislados de *C. albicans* resistentes a azoles. Un estudio documenta la resistencia a azoles en mas de un tercio de aislados orales de *C. albicans* de pacientes VIH positivos. En años recientes, la resistencia a antifúngicos ha sido documentada en otras poblaciones de pacientes como en los trasplantes de médula ósea. Existen varias razones por las cuales una infección no responde a un antifúngico, dentro de las cuales se puede incluir el estado inmunológico del paciente, las características del fármaco y la susceptibilidad del hongo a la droga (White *et al.*, 2002).

Las especies del género *Candida* son de forma habitual comensales del ser humano, pueden causar un variado espectro de enfermedades, sin embargo, una preocupación mayor es el desarrollo de una infección diseminada, la cual ocurre con alta prevalencia en pacientes inmunocomprometidos. La candidiasis oral es la infección fúngica humana más común. La incidencia de aislados de *C. albicans* de cavidad oral se ha reportado ser de 45% en neonatos, 45-65% en niños sanos, 30-45% en adultos sanos, 50-65% en personas que utilizan dentaduras postizas, 90% en pacientes con leucemia aguda y que reciben quimioterapia y 95% en pacientes con VIH (Akpan y Morgan, 2002). *Candida albicans* es la causa mayor de candidiasis invasiva, así como uno de los patógenos más frecuentemente aislados de sangre de pacientes inmunocomprometidos durante la última década. En los Estados Unidos de América, la candidiasis es la tercera causa más común de infección sanguínea, principalmente en neonatos. Cerca del 70% de las mujeres adultas presentan en su vida al menos un episodio de candidiasis vulvovaginal; la candidiasis orofaríngea es una infección oportunista común en pacientes con SIDA y cerca del 85-90% de estos pacientes la desarrollan en boca, esófago y/o sistema urinario. La candidiasis superficial en mucosa tiene una ocurrencia porcentual media en pacientes de SIDA mientras que ésta es común en individuos inmunosuprimidos por tratamiento de cáncer o algún trasplante. Estas condiciones, causan un aumento en la morbilidad y mortalidad de la infección, y una de las principales razones es que el diagnóstico se dificulta ya que los síntomas no son específicos (Sandhu *et al.*, 1995).

Las técnicas moleculares basadas en la demostración de variaciones en las secuencias conservadas de ADN, han llevado a la generación de métodos de identificación basados

totalmente en la detección de polimorfismos de ADN. El análisis de Polimorfismos de Longitud de Fragmentos Amplificados (AFLP's) es una técnica relativamente nueva. Ha demostrado ser conveniente para la identificación así como para la tipificación de cepas. También ha probado ser una técnica robusta y reproducible y es un método genotípico de alta resolución casi ideal conveniente para uso clínico (Borst *et al.*, 2003).

4. HIPOTESIS

A partir de la caracterización de la diversidad genética de aislados clínicos de *Candida albicans* se puede determinar si existe relación entre los grupos de asociación y la resistencia que presentan al fluconazol.

5. OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar la diversidad genética de aislados clínicos de *Candida albicans* en la zona Metropolitana de Monterrey mediante Análisis genotípico de Polimorfismos de Longitud de Fragmentos Amplificados (AFLP's) y evaluar si existe correlación entre los grupos asociados en ésta y la resistencia a fluconazol.

5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Caracterizar la susceptibilidad al fluconazol de aislados de muestras clínicas de *C. albicans* mediante la técnica Drop Test.

Aislar y cuantificar ADN genómico de aislados clínicos de *C. albicans* con diferentes grados de susceptibilidad a fluconazol.

Describir mediante el análisis estadístico de los AFLPs y presentando un árbol filogenético la diversidad genética de la población de aislados clínicos de *C. albicans* en la zona metropolitana de Monterrey.

Evaluar si existe relación entre los grupos de Polimorfismos de Longitud de Fragmentos Amplificados de las muestras clínicas de *C. albicans* y la susceptibilidad a fluconazol.

6. ANTECEDENTES

6.1 Género *Candida*

El género *Candida* está formado por hongos levaduriformes de pared delgada, pequeños (4-6 μm), ovales que se reproducen por gemación o fisión. De aproximadamente 200 especies, son ubicuas en el ambiente (asociadas frecuentemente con plantas y animales), sin embargo aproximadamente una docena de estas especies se ha asociado con comensalismo o enfermedades en humanos. Las especies de *Candida* medicamente importantes son: *Candida albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. kefyr*, *C. guilliermondii*, *C. lusitaniae*, *C. stellatoidea*, *C. dubliniensis*, *C. norvegensis*, *C. famata* y *C. inconspicua*. (Dismukes et al, 2003; Kavanagh, 2005).

6.1.1 *Candida albicans*

Es un hongo dimórfico que forma largas pseudohifas, hifas y blastoconidias (células gemantes subesféricas de 3-8 x 2-7 μm). Asimila y fermenta azúcares. Produce numerosas clamidosporas unicelulares, redondas u ovaladas, con gruesa pared refringente (8-16 μm de diámetro), situadas al final de las hifas, pseudohifas o laterales sobre blastoconidias ovaladas. Las colonias son de crecimiento rápido, circulares, lisas, blancas o cremosas, pastosas y blandas, de bordes precisos, centro ligeramente prominente (Bial-Arístegui, 2002; Larone DH, 2002).

C. albicans está asociada ecológicamente a seres vivos de sangre caliente. Su temperatura óptima de crecimiento es 37 °C. Los tractos digestivo y respiratorio, junto con la mucosa genital (vagina), son los reservorios más importantes en los seres humanos y origen de candidiasis endógenas. No sobrevive mucho tiempo en superficies secas pero su supervivencia es mayor cuando hay humedad y se ha aislado de los cepillos dentales, cremas de manos, cosméticos y ropa (García-Ruíz, 2004; Bial-Arístegui, 2002).

C. albicans permanece como el principal patógeno fúngico en el hombre y la causa más común de infección fúngica mucosa y sistémica; es la especie mejor caracterizada del género (Dismukes *et al*, 2003).

La simple permanencia de *Candida* como comensal o su proliferación, la invasión a tejido y producción de candidiasis están determinados por cambios en el ambiente del hospedero. La relación de comensal es dependiente del mantenimiento de la integridad del tejido del huésped con la flora microbiana normal así como de un sistema inmune intacto. Mientras que se mantengan estas condiciones del huésped, la candidiasis mucosa no se observa clínicamente. Sin embargo, una ruptura en la integridad anatómica o una oportunidad en la flora microbiana residente pueden llevar a condiciones ambientales favorables para el crecimiento de *Candida* spp. con potencial para invadir al huésped. Tales condiciones ambientales en conjunción con un desbalance en la respuesta de citocinas del huésped puede llevar a un incremento en la colonización de tejido y crecimiento desmedido resultando en una candidiasis mucosa. Las infecciones producen un rango de superficial a sistémico. Este último se observa principalmente en individuos con deficiencias inmunológicas representando un importante problema clínico (Henriques *et al*, 2006) y un alto riesgo de muerte. Además tiene un fuerte impacto en el tiempo de permanencia en hospitalización del paciente y costos asociados con el tratamiento relacionados con la unidad médica. Se han establecido a nivel mundial varios programas de vigilancia para estudiar la distribución de las especies invasivas de *Candida* y su susceptibilidad a antifúngicos (St-Germain, 2008).

Las infecciones fúngicas oportunistas se han convertido en una gran amenaza para el humano. Este oportunismo es favorecido por un gran número de factores ligados principalmente a procedimientos terapéuticos, como el uso indiscriminado de antibióticos y esteroides, citotóxicos, trasplantes de médula ósea y órganos sólidos, instalación de catéteres venosos, nutrición parenteral así como la drogadicción, neoplasias, síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), collagenopatías, prematuridad y diabetes mellitus. La severidad de las micosis oportunistas depende principalmente de la incapacidad del sistema inmune del individuo para limitar el proceso infeccioso, de los factores de virulencia del hongo y de las condiciones del microambiente en que se lleva a cabo la interacción hospedero-parásito (Hernández-Hernández *et al.*, 2003). De los diversos hongos potencialmente invasivos, *Candida* spp. y *Aspergillus* spp., son los responsables de la mayoría de las infecciones, especialmente *C. albicans* y *A. fumigatus* (Larriba *et al.*, 2000).

6.1.2 Especies de *Candida* no-*albicans*

Desde 1980, ha habido un marcado incremento en infecciones de torrente sanguíneo debido a especies de *Candida* no-*albicans*, especialmente *C. glabrata* en los Estados Unidos, *C. parapsilosis* y *C. tropicalis* en Europa, Canadá y Latinoamérica (Trofa *et al.*, 2008).

C. parapsilosis es un patógeno exógeno que puede ser encontrado en la piel principalmente y en superficies mucosas. Presenta células ovales, redondas o cilíndricas. Cuando crece en agar dextrosa Sabouraud las colonias son blancas, cremosas, brillantes y lisas o arrugadas (Trofa *et al.*, 2008).

Existen algunas variaciones en la composición y el tamaño del genoma entre *C. albicans* y *C. parapsilosis*. En cuanto al tamaño del genoma, *C. albicans* presenta 14.4 Mb mientras que *C. parapsilosis* tiene 13.1 Mb. El contenido de GC es mayor en *C. parapsilosis* (38.7%) que en *C. albicans* (33.5%). *C. albicans* tiene mayor número de genes que *C. parapsilosis* (6,159 contra 5,733) (Butler G *et al.*, 2009). Estudios de la organización genética del ADN mitocondrial de *C. parapsilosis* revelaron que la mayoría de los aislados posee una estructura lineal, en contraste a la típica estructura circular encontrada en la mitocondria en *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. orthopsilosis* y *S. cerevisiae*. Además *C. parapsilosis* carece de diversidad de secuencia nucleotídica. La frecuencia de mutación en *C. albicans* es alrededor de 1/140 pb en la regiones codificantes examinadas. En cambio, en *C. parapsilosis* se han encontrado solo 2 sitios polimórficos nucleotídicos entre secuencias de 7.5 kb y solo 4 mutaciones en más de 36 kb. La falta de diversidad de secuencia nucleotídica sugiere que *C. parapsilosis* es altamente clonal y solo recientemente, en el paso de 1 millón años, emergió como una especie (Trofa D *et al.*, 2008).

C. parapsilosis es conocida por su habilidad para formar biopelículas en catéteres y otros dispositivos de implantes, una alta diseminación nosocomial por mala higiene de manos primordialmente y persistencia en ambientes hospitalarios. También es de especial interés en neonatos críticamente enfermos, causando más de un cuarto de todas las infecciones fúngicas invasivas en infantes con bajo peso al nacer en Reino Unido y más de un tercio de las infecciones de torrente sanguíneo por *Candida* en neonatos en Norte América. Adicionalmente, es el organismo fúngico predominante aislado en unidades de cuidado intensivo de neonatos, donde frecuentemente se asocia con la mortalidad de los mismos (Pfaller *et al.*, 2008; Trofa *et al.*, 2008).

Se ha confirmado una susceptibilidad general de *C. parapsilosis* tanto al fluconazol como al voriconazol y existe documentación de una inusual área de resistencia en Sudáfrica. Este decremento de susceptibilidad al fluconazol puede estar potenciado por la propensión de esta especie a formar extensas biopelículas en catéteres y otros dispositivos (Pfaller *et al.*, 2008).

Recientemente *C. glabrata* ha emergido como un importante patógeno en varias situaciones hospitalarias, donde es responsable del incremento en el número de infecciones sistémicas y candidemia (Sanguinetti *et al.*, 2005).

Casi todas las especies de *Candida*, con excepción de *C. glabrata* y *C. krusei*, pertenecen al mismo clado de *Candida* caracterizado por la traducción del codón CUG a serina en vez de leucina. Basándose en esta característica, *C. glabrata* recae en el clado de *Saccharomyces* (Butler *et al.*, 2009).

Aunque la infección por *C. glabrata* es la segunda o tercera en frecuencia, después de *C. albicans*, como una infección difícil de tratar y asociada a un alto grado de mortalidad en pacientes hospitalizados de alto riesgo, a la fecha se conoce poco acerca de la epidemiología, patogénesis, tratamiento y sobre todo, de la resistencia antifúngica de los aislados de *C. glabrata*. Comparada con otras especies de *Candida*, especialmente *C. albicans*, las concentraciones mínimas inhibitorias de todos los azoles para los aislados de *C. glabrata* tienden a ser más altas y además las cepas de *C. glabrata* son intrínsecamente menos susceptibles a todos los agentes antifúngicos, incluyendo la anfotericina B. Aunque se ha reportado resistencia primaria *in vitro* al fluconazol, la resistencia adquirida a los azoles, es por mucho, la forma de resistencia más común en *C. glabrata*, observándose principalmente para el fluconazol. El potenciamiento en el flujo de droga es un mecanismo importante de resistencia a azoles en *C. glabrata* y surge como resultado de una sobre regulación de los genes transportadores multidrogas, tales como *CDR1* y *CDR2* de *C. glabrata* (Sanguinetti *et al.*, 2005). Otro mecanismo de resistencia a azoles es la sobreexpresión o mutación de *ERG11*. Recientemente, otro de los genes transportadores multidrogas regulado por Pdr1p, *CgSNQ2*, se ha visto que participa en la resistencia a azoles en aislados clínicos de *C. glabrata* (Ferrari *et al.*, 2009).

6.2 Factores Moleculares que Generan Resistencia

El blanco de actividad de los azoles es la lanosterol 14 α -demetilasa, una enzima codificada por el gen *ERG11* (Erg11p). El resultado es la inhibición de la síntesis del ergosterol, acumulación de productos tóxicos e inhibición del crecimiento (Espinel-Ingroff, 2008).

Los mecanismos de resistencia a los azoles han sido investigados a nivel molecular por diversos autores y se ubican en diferentes categorías. Entre éstos se incluyen la sobreexpresión o mutación de la enzima blanco lanosterol 14 α -demetilasa (gen *ERG11*), mutaciones en otras enzimas de la ruta de biosíntesis del ergosterol y un incremento en la expresión de las bombas de flujo. Los mediadores del flujo de azoles de *C. albicans* incluyen las bombas Mdr1p y Flu1p pertenecientes a la clase de MFS (de sus siglas en ingles *Major Facilitator Superfamily*) y los transportadores ABC (de sus siglas en ingles *ATP-binding cassette*) Cdr1p y Cdr2p (White *et al.*, 2002; Coste *et al.*, 2007; Holmes *et al.*, 2008).

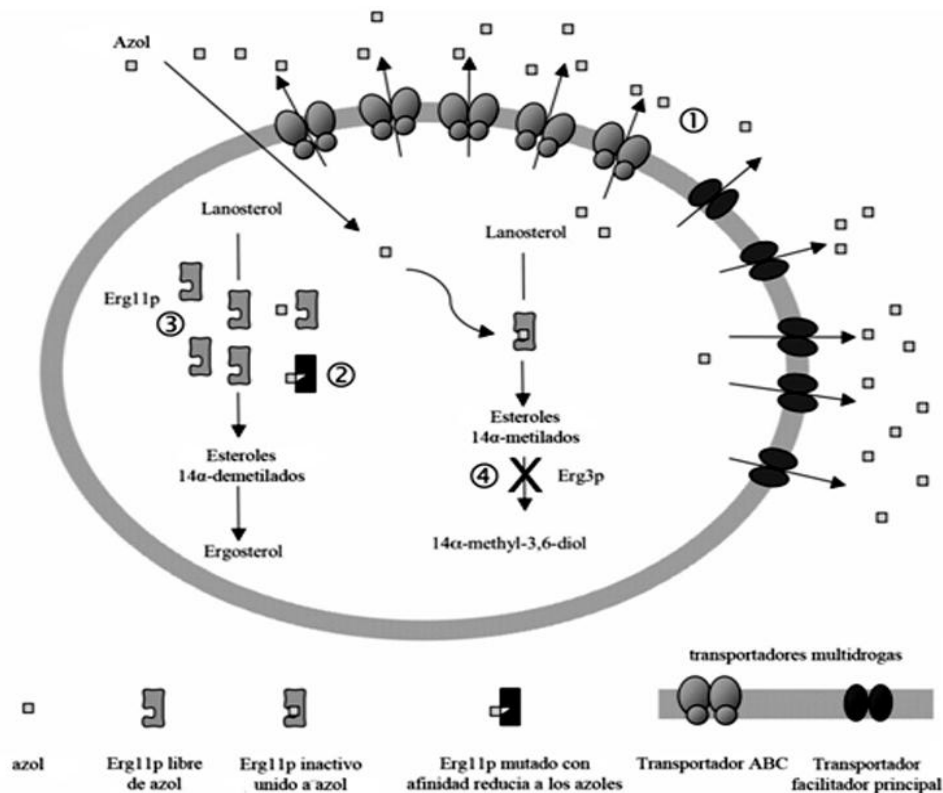


Fig 1. Esquema de mecanismos reportados de resistencia a azoles.

En todas las especies fúngicas, *ERG11* es el gen que codifica la enzima Erg11p o lanosterol 14α-demetilasa, esencial para la síntesis del ergosterol. La sobreexpresión de este gen causa un incremento en el número de copias de la enzima resultando en un aumento de la síntesis de ergosterol sobrepasando la capacidad del antifúngico. La resistencia también se ha asociado con mutaciones puntuales de *ERG11*, generando cambios conformacionales que reducen la efectividad de unión entre los azoles y su blanco (White *et al.*, 1998; Casalnuovo *et al.*, 2004). La sobreexpresión de *ERG11* es causada por una mutación de ganancia de función en Upc2p, un factor de transcripción de dedos de zinc. La sobreexpresión de *UPC2* incrementa la resistencia a azoles, mientras que cepas mutantes que carecen de *UPC2* no muestran inducción de los genes *ERG* y son hipersusceptibles a estas drogas (Dunkel *et al.*, 2008).

Al inhibir el funcionamiento de Erg11p, se produce la acumulación de precursores tóxicos de ergosterol como el 14α-metilergosta-8,24-dien-3β,6α-diol por acción de Erg3p. Pero cuando Erg3p se inactiva por una mutación, las células en presencia del fluconazol acumulan un esteroide no tóxico 14α-metilfecosterol, sobreviviendo al fármaco (Cannon *et al.*, 2007).

El incremento en expresión de los genes *ERG1* (escualeno epoxidasa) y *ERG2* (esterol isomerasa) también se asocia con resistencia a fluconazol (Casalnuovo *et al.*, 2004).

Las bombas de flujo pertenecen a dos clases diferentes: los transportadores ABC y los MFS. Los transportadores ABC son dependientes de energía por hidrólisis de ATP y los transportadores MFS operan a través de gradiente de protones. En aislados de *C. albicans* resistentes a azoles se ha observado una sobreexpresión de 2 genes transportadores ABC, *CDR1* y *CDR2* (de sus siglas en inglés *Candida Drug Resistance*), así como el gen *MDR1* (de sus siglas en inglés Multidrug Resistance) que codifica para un transportador MFS (Casalnuovo *et al.*, 2004; Niimi *et al.*, 2004). Los hongos dedican una gran parte de su genoma hacia la codificación de transportadores, existiendo aproximadamente de 10 a 30 genes que codifican transportadores por megabase de ADN genómico en el genoma fúngico. Conjuntamente, estas dos superfamilias suman aproximadamente la mitad de todos los genes que codifican transportadores en genomas fúngicos. A la fecha se han detectado un total de 21 transportadores ABC y 85 MFS en el genoma de *C. albicans* (Coleman y Mylonakis, 2009).

En la mayoría de las cepas con CMI $\geq 64 \mu\text{g ml}^{-1}$ de fluconazol se observa una elevada expresión de ARNm de *CDR1* y *CDR2*. De acuerdo con Holmes *et al.* 2008, se analizaron 18 aislados clínicos de *C. albicans*, incluyendo 13 cepas con susceptibilidad reducida al fluconazol, bajo condiciones de crecimiento *in vitro*, determinándose que Cdr1p está presente en mayores cantidades (2-20 veces más) que Cdr2p tanto en los aislados clínicos resistentes como sensibles a fluconazol.

Se ha observado que la sobre regulación de *CDR1* y *CDR2* en aislados resistentes a azoles se debe a una mutación de ganancia de función en el factor de transcripción de dedos de zinc Tac1p. La mayoría de estas mutaciones consisten en sustituciones aminoacídicas en el carboxilo terminal o pequeñas deleciones en el marco de lectura. Los transportadores Cdr1p y Cdr2p comparten un 84% de identidad de secuencia aminoacídica y son homólogos cercanos de Pdr5p de *S. cerevisiae*, uno de los principales efectores de tolerancia celular a compuestos xenobióticos en levaduras gemantes (Tsao *et al.*, 2009).

Se determinó que la delección de *CDR1* reduce los niveles de resistencia de 4 a 8 veces sobre los azoles fluconazol, ketoconazol e itraconazol, mientras que la delección de *CDR2* afecta muy poco la resistencia a fluconazol y ketoconazol y no afecta la resistencia a itraconazol. Por lo tanto, Cdr1p tiene mayor importancia en la resistencia a fluconazol, ketoconazol e itraconazol mientras que Cdr2p juega un papel menor. También se ha visto que Cdr1p y Cdr2p funcionan como flipasas de fosfolípidos, siendo capaces de translocar fosfolípidos fluorescentes a través de la bicapa lipídica de manera dependiente de ATP y es posible que la abolición de la actividad de Cdr1p y Cdr2p pueda causar una gran alteración en la distribución asimétrica de los fosfolípidos de la membrana celular lo cual podría agravar la respuesta celular a drogas (Tsao *et al.*, 2009).

A diferencia de los transportadores ABC, la resistencia conferida por los transportadores MFS es más específica para el fluconazol que para otros azoles, aunque

se han identificado otros sustratos (Coleman y Mylonakis, 2009). Mientras que *MDR1* se expresa normalmente a bajos niveles en medios de laboratorio estándar, muchos aislados clínicos de *C. albicans* resistentes a fluconazol sobre expresan constitutivamente *MDR1*. La delección de éste gen de los aislados clínicos que sobre expresan *MDR1* genera mutantes con un decremento en la resistencia a fluconazol, confirmando que la sobreexpresión de *MDR1* contribuye al fenotipo resistencia de estos aislados (Hiller *et al.*, 2006).

La expresión de *MDR1* también es controlada por un factor de transcripción de la familia de dedos de zinc, denominado Mrr1p. Según Dunkel *et al.*, 2008 la inactivación de *MRR1* en dos aislados resistentes a fluconazol resultó en la pérdida de expresión de *MDR1* y un incremento en la susceptibilidad a fluconazol y a otros inhibidores metabólicos que se supone son sustratos de la bomba de flujo Mdr1p, como la cerulenina y brefeldina A. Por otra parte, la delección de *MRR1* de la cepa modelo SC5314 de *C. albicans* susceptible a droga también nulificó la expresión de *MDR1* en presencia de químicos inductores, como el benomil y el peróxido de hidrógeno, demostrando que Mrr1p media la expresión inducible de *MDR1* en cepas susceptibles y la sobreexpresión constitutiva de *MDR1* en cepas resistentes.

6.3 Factores de Virulencia

6.3.1 Adherencia

Uno de los requerimientos más importantes para cualquier microbio, sea comensal o patógeno, es la habilidad para adherirse al tejido del hospedero. Esto requiere que la célula microbiana sea capaz de reconocer y pegarse a los ligandos del hospedero, tales como proteínas de la matriz extracelular y componentes de la membrana celular. Hasta ahora se han identificado varias de estas proteínas en *C. albicans*. Las adhesinas se unen a un rango de proteínas del hospedero, tales como la fibronectina, laminina, colágeno, vitronectina y componentes del complemento, así como a partes de carbohidratos de glicolípidos y glicoproteínas de membrana de la superficie celular del hospedero (Kavanagh, 2005). Esta gran familia de proteínas, conocida como la familia ALS (de sus siglas en inglés *Alpha-agglutinin-like sequence*), se ha visto que está involucrada en las interacciones levadura-célula hospedera. Está compuesta por 8 proteínas glicosiladas con homología a las α -aglutininas de *S. cerevisiae*. Los genes ALS son regulados diferencialmente por condiciones fisiológicas relevantes como cambios en el medio de crecimiento (*ALS1*), forma morfológica (*ALS3/ALS8*) y etapa de crecimiento (*ALS4*) (Henriques *et al.*, 2006). También se ha observado que las superficies de las células de *C. albicans* expresan una proteína llamada proteína hifal de pared (Hwp1), la cual parece actuar como sustrato para las enzimas del hospedero (transglutaminasas) que puede unir

covalentemente las proteínas Hwp1 directamente a proteínas en la superficie de células epiteliales (Kavanagh, 2005).

6.3.2 Dimorfismo

Una de las características fenotípicas más importantes de *C. albicans* es su habilidad para existir como blastospora ovoide y como hifas elongadas (dimorfismo). Ambas formas han sido observadas en muestras de tejido y es posible que cada una de ellas contribuya en diferentes etapas o diferentes tipos de infección. Existen varias condiciones ambientales que inducen la formación de hifas, por ejemplo la presencia de suero, temperatura de crecimiento superior a 35°C, falta de nutrientes y pH mayor a 6.5. Sin embargo la naturaleza precisa de los cambios genéticos involucrados todavía no se comprende en su totalidad. También se han asociado varios factores de virulencia con cambios morfológicos específicos (la adhesina Hwp1 y diversas aspartil proteinasas).

Otro factor de virulencia es el cambio fenotípico. Cuando una sola cepa de *C. albicans* se crece en una placa con agar, frecuentemente se observan inusuales variantes coloniales (generalmente a una frecuencia de 1 en 1000). Estas colonias pueden tener diferente forma, textura o color y la alterada arquitectura colonial se debe usualmente a alteraciones en las morfologías de las células constituyentes. El evento de cambio es reversible, lo cual sugiere que existe un preciso interruptor genético responsable del encendido y apagado de un amplio rango de genes. Se ha visto que los tipos de cambio fenotípico difieren en su habilidad para expresar diversos factores de virulencia (adhesinas, proteinasas y dimorfismo) y por lo tanto se ha sugerido que el cambio fenotípico es un medio que le permite a la levadura generar diversidad para facilitar la adaptación a crecer en diversos ambientes y posiblemente a evadir la respuesta inmune del hospedero (Kavanagh, 2005).

6.3.3 Plasticidad Metabólica

Como es el caso para la mayoría de los patógenos, *C. albicans* produce una amplia variedad de enzimas extracelulares que pueden digerir las proteínas del hospedero. Particularmente contiene una familia de aproximadamente 10 proteínas relacionadas entre sí llamada aspartil proteinasas de secreción (SAPs), las cuales tienen la habilidad de hidrolizar una gran cantidad de proteínas del hospedero que van desde componentes de la matriz hasta proteínas del sistema inmune tales como anticuerpos. Los productos de *SAP1* a *SAP3* y de *SAP4* a *SAP6* son aproximadamente 67% y 89% idénticos, respectivamente. Todas las especies de *Candida* secretan proteinasas, pero las especies

distintas a *C. albicans* parecen hacerlo a un nivel más bajo. Sap2p es la principal proteína Sap producida *in vitro* y la más estudiada hasta ahora por sus propiedades. Las proteinasas aspárticas tienen un pH óptimo ácido. Esta es una importante desventaja para *C. albicans*, ya que los tejidos del hospedero tienen un pH neutro o menos ácido. *C. albicans* es un comensal de la vagina, donde se presenta un pH ácido y de la cavidad oral con un pH neutro. El pH normal de la sangre es de 7.4. Hay algunas diferencias entre las SAPs en respuesta al pH, cubriendo un rango de actividad de pH de 2 a 7. Sap1-3p tienen su actividad más alta a valores bajos de pH (pH de 3-5), mientras que Sap4-6p tienen mayor actividad a valores altos de pH (pH de 5-7) (Chaffin, 2008).

Asimismo *C. albicans* también codifica una familia de lipasas y fosfolipasas que se han implicado en virulencia. La familia de las lipasas contiene 10 genes, *LIP1* a *LIP10*, de las cuales *LIP7* carece de señal de secreción. Las secuencias de proteína son similares, con un 80% de identidad aminoacídica. La expresión de algunas lipasas (*LIP2* y *LIP9*) en ausencia de lípidos sugiere que pudieran existir funciones adicionales para estas enzimas. También hay diferencias en respuesta a otras condiciones *in vitro*. *LIP1* es reprimido por α -feromonas, *LIP4* se expresa más en células opacas que en blancas y *LIP6* es inducido en condiciones de adherencia a poliestireno. Los organismos que se exponen a fluconazol muestran un modesto decremento en la expresión de *LIP4* y un incremento en la expresión de *LIP8*. Interesantemente, ciertas proteinasas y lipasas son estrictamente reguladas, expresándose únicamente en fenotipos morfológicos o cambios específicos (Chaffin, 2008).

6.4 Epidemiología

De acuerdo a uno de los últimos reportes del Programa de Vigilancia Antimicrobiana SENTRY, *C. albicans* es la especie que se aísla con mayor frecuencia (48.7%), seguida de *C. parapsilosis* (17.3%), *C. glabrata* (17.2%), *C. tropicalis* (10.9%), *C. krusei* (1.9%) y otras *Candida* spp. (5.2%) (Messer *et al.*, 2006).

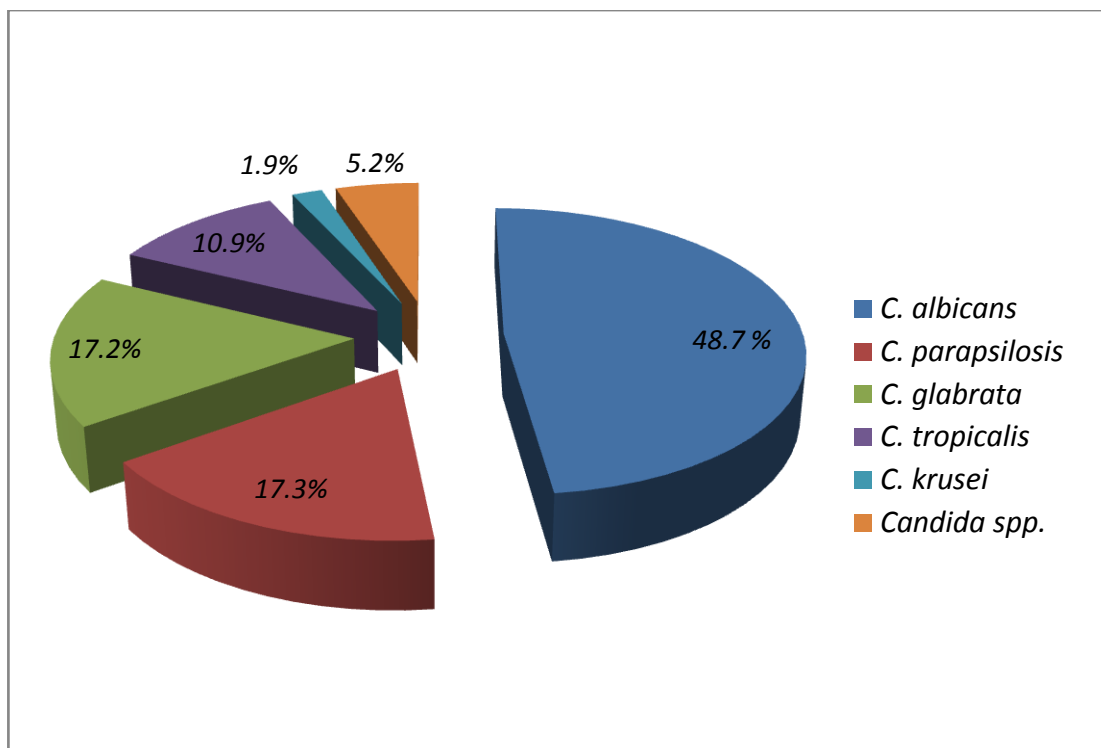


Fig 2. Frecuencia de aislamientos de *Candida* en pacientes hospitalizados del Programa de Vigilancia Antimicrobiana SENTRY (Messer *et al.*, 2006).

Varios estudios de vigilancia han sido establecidos para estudiar la distribución de las especies invasivas de *Candida* y su susceptibilidad a diversos antifúngicos. Desde su inicio en 1997, uno de los objetivos del programa SENTRY ha sido examinar la frecuencia de ocurrencia y la resistencia a antifúngicos entre las especies de levaduras provenientes de infecciones de torrente sanguíneo y de sitios corporales normalmente estériles en Norte América, Europa y Latinoamérica. Las frecuencias de las especies aisladas a lo largo de estos años, han mostrado consistentemente una tendencia hacia un decremento en la prevalencia de *C. albicans* en todas las regiones (Norte América 55 a 51%; Europa 58 a 52% y América Latina 45 a 36%) y un incremento en la prevalencia de las especies de *Candida* no-*albicans*, específicamente *C. parapsilosis*, *C. glabrata* y *C. tropicalis* (Messer *et al.*, 2006). La epidemiología específica relacionada con la incidencia de candidemia así como la distribución de los patógenos de *Candida* (*C. albicans* vs. especies no-*albicans*) varía grandemente de país a país lo mismo que de una región a otra. Las razones de éstas variaciones no están muy bien entendidas aún (Ruhnke *et al.*, 2008). Aunque se estima que esta tendencia continúe, actualmente en Norte América y la mayoría de los países del mundo, *C. albicans* continua siendo la especie más común causante de candidemia (St-Germain *et al.*, 2008).

Se han reportado más de 20 especies diferentes de *Candida* como agentes etiológicos de candidiasis invasiva en humanos. Aunque más del 90% de las infecciones invasivas debido a *Candida* spp. pueden ser atribuidas a 5 especies, *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* y *C. krusei*, la lista de especies reportadas sigue creciendo conforme a los laboratorios se les presiona para que provean una identificación a nivel de especie y sirva como una ayuda para optimizar la terapia de las infecciones por

Candida spp. (Fridkin y Jarvis, 1996; Pfaller *et al.*, 2007). Se han registrado bajos rangos de resistencia tanto al fluconazol como al voriconazol entre distintos aislados de *C. albicans* provenientes de varias partes del mundo, aunque los aislados de Norte América son los que presentan mayor resistencia que aquellos de otras regiones (Pfaller *et al.*, 2007).

C. albicans es el patógeno fúngico humano mejor estudiado y sirve como un organismo modelo para el estudio de otros hongos infecciosos. En los últimos años, la frecuencia de infecciones fúngicas ha crecido constantemente y aunque estas infecciones son menos frecuentes que las bacterianas, al menos dos aspectos las hacen cada vez más importantes. Primero, las infecciones oportunistas en pacientes inmunocomprometidos representan cada vez más una causa común de mortalidad y morbilidad. Segundo, muchos de los actuales compuestos antifúngicos utilizados son frecuentemente de uso limitado debido a su toxicidad y efectos secundarios (Arnaud *et al.*, 2005). Las infecciones fúngicas invasivas atribuidas a *Candida* son particularmente prevalentes después de un trasplante de órgano, especialmente en el período inmediato post-trasplante. *Candida* puede desencadenar infecciones del tracto urinario, respiratorio, gastrointestinal, esofágico y de torrente sanguíneo en personas con alguna clase de trasplante de órgano sólido, con una prevalencia durante los primeros 6 meses de entre 5% y 50% dependiendo del tipo de trasplante (renal vs. hepático). Se ha reportado que más del 80% de los episodios de esofagitis por *Candida* en pacientes con trasplante renal fueron precedidos por una colonización oral (Dongari-Bagtzoglou *et al.*, 2009).

El término candidiasis invasiva incluye candidemia, candidiasis diseminada involucrando órganos profundos, endocarditis y meningitis, excluyendo las enfermedades menos severas y superficiales como la candidiasis orofaríngea y esofágica. La candidiasis invasiva tiene una mortalidad atribuible de 40% a 50% y se ha reportado un incremento en unidades de cuidado intensivo (UCI) (De Rosa *et al.*, 2009). Los resultados del Estudio de Vigilancia Global Antifúngica ARTEMIS DISK mostraron que *C. albicans* se aisló principalmente en pacientes hospitalizados en servicios médicos y en UCI y en menor número en los servicios de dermatología y urología. Además constituyó más del 70% de las muestras aisladas de tracto respiratorio (71%) y genital (79%) (Pfaller *et al.*, 2007).

En los Estados Unidos de América, *Candida* es la cuarta causa más común de infecciones en el torrente sanguíneo y en estudios Europeos representa del quinto al décimo patógeno causal más común. *Candida* causó el 2.3% de todos los episodios de infecciones en el torrente sanguíneo en 93 hospitales franceses. Un estimado de 33-55% de todos los episodios de candidiasis ocurren en unidades de cuidado intensivo (Bouza y Muñoz, 2008). *C. albicans* es la segunda causa de infecciones nosocomiales del tracto urinario en UCI de acuerdo a reportes del sistema de Vigilancia Nacional de Infecciones Nosocomiales (Ergon y Gulay, 2005).

La candidiasis vulvovaginal es una condición muy común en mujeres y su incidencia se ha incrementado fuertemente en las últimas décadas. Se estima que el 75% de las mujeres tienen al menos un episodio de vaginitis durante su vida mientras que la candidiasis vulvovaginal recurrente afecta al 5% de las mujeres en edad reproductiva. La

candidiasis vulvovaginal recurrente se define como el inicio de 4 infecciones de vaginitis en un período de un año. *C. albicans* es la especie más común causante de candidiasis vulvovaginal y recurrente (Lian *et al.*, 2004; Chong *et al.*, 2007).

A principios de los 90's un incremento del uso de fluconazol para tratar pacientes VIH positivos con candidiasis orofaríngea recurrente resultó en la selección de especies de *Candida* intrínsecamente menos susceptibles a azoles y la emergencia de cepas resistentes en éstos pacientes debido a la adquisición de resistencia por cepas previamente susceptibles. Un estudio realizado por la Encuesta Nacional de Epidemiología de Micosis demostró que existen variaciones geográficas en cuanto a la distribución de especies a través de los Estados Unidos, con *C. albicans* en un rango de 46% en el noreste a 70% en el suroeste y *C. glabrata* con 15% en el suroeste a 26% en el noreste (Hajjeh *et al.*, 2004).

La candidiasis orofaríngea es la infección fúngica oportunista más frecuente en personas VIH positivas y se ha estimado que más del 90% de pacientes VIH positivos desarrollan esta infección en algún punto de la progresión de su enfermedad. La mayoría de los pacientes (77 de 100%) con candidiasis orofaríngea son infectados por *C. albicans*, mientras que el resto de éstos están infectados con una o más especies de *Candida* no-*albicans*, ya sea sola o en combinación con *C. albicans* (De Repentigny *et al.*, 2004).

La principal fuente de infección en los humanos es la vía endógena; es comensal de la piel, del tubo digestivo, de las vías respiratorias superiores y del tracto genital femenino; la piel y las mucosas intactas son la primera barrera defensiva frente a su infección. También es posible la transmisión entre pacientes en ambientes hospitalarios (Odds, 1988). No obstante, han sido descritas infecciones invasoras de claro origen exógeno, casi siempre nosocomial, procedentes de la manipulación de catéteres, dispositivos intravasculares, hiperalimentación o de la piel, colonizada en el momento de su inserción (García-Ruiz, 2004).

6.5 Técnicas de Detección de Resistencia

En los últimos años se han estandarizado varias técnicas *in vitro* para la detección de la resistencia de los agentes etiológicos, que muestran correlación con la evolución clínica de los enfermos. Por eso, parece cada vez más importante conocer el perfil de susceptibilidad de las cepas clínicas y el espectro de acción de los antifúngicos. En términos de costo real, las pruebas de susceptibilidad, exactas y precisas, son necesarias con el fin de establecer la posible eficacia clínica y orientar al médico en su decisión terapéutica (Torres *et al.*, 2009).

El Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI de sus siglas en inglés *Clinical and Laboratory Standards Institute*) ha desarrollado y publicado el método de

referencia aprobado de macrodilución en caldo (M27-A3) para especies de *Candida*. El método de macrodilución en caldo está dirigido hacia levaduras causantes de infecciones invasivas. Entre éstas se encuentran *Candida* spp. (incluyendo *C. glabrata*) y *C. neoformans*. El método M27-A3 representa un estándar de referencia desarrollado a través de un consenso para facilitar el acuerdo entre laboratorios en la determinación de la susceptibilidad de levaduras a agentes antifúngicos (CLSI, 2008).

Otro método desarrollado por el CLSI es el M44-A2 el cual es un método de difusión en disco para levaduras. Actualmente está validado solamente para *Candida* spp. contra diversos azoles y equinocandinas. Este método provee resultados cualitativos después de 20 a 24 h de incubación. Además, el uso de agar Mueller-Hinton suplementado en lugar del medio RPMI 1640 facilita la prueba de susceptibilidad para algunos laboratorios clínicos reduciendo costos. Los criterios de interpretación (puntos de corte) para caspofungina, fluconazol y voriconazol y los parámetros de control de calidad para caspofungina, fluconazol, posaconazol y voriconazol han sido establecidos de acuerdo a los procedimientos estándar del CLSI (CLSI, 2009).

Por otro lado, se han desarrollado otras alternativas como las técnicas basadas en caldo, los métodos colorimétricos comerciales Sensititre Yeast One[®], Fungitest[®] y ASTY[®] y técnicas basadas en la difusión en agar, como la epsilometría E-test[®] que han sido ampliamente evaluados en levaduras con los antimicóticos actuales de uso común (Torres *et al.*, 2009). En Noviembre de 2001, el panel de prueba Sensititre YeastOne[®] (Trek Diagnostic Systems, Inc., Westlake, OH) que incorpora el indicador alamar azul como indicador colorimétrico, fue aprobado por la FDA para su comercialización como un método nuevo y menos laborioso para la determinación de la CMI (Concentración mínima inhibitoria) de fluconazol, itraconazol y flucitosina para levaduras. El método E-test[®] (AB BIODISK, Solna, Suecia) se basa en tirillas de plástico que contienen un gradiente de concentración de antifúngicos predefinidos las cuales se colocan sobre placas con agar para la determinación de la CMI de varios agentes, reduciendo el esfuerzo requerido para las pruebas rutinarias de susceptibilidad (Alexander *et al.*, 2007). El Fungitest[®] es una prueba de punto de corte, en la cual el crecimiento de los aislados es medido en cultivos que contienen solo una o dos concentraciones del fármaco para distinguir cepas susceptibles de resistentes. Las comparaciones del panel Fungitest[®] con el método de microdilución de CLSI han demostrado una buena relación entre éstos para cepas susceptibles a azoles de *Candida* spp., aunque por otro lado se ha visto que el procedimiento de punto de corte frecuentemente falla en la detección de cepas resistentes a azoles (Espinell-Ingroff, 2002).

6.6 Tratamiento. Azoles

Los antifúngicos azólicos o azoles son un grupo de fármacos fungistáticos sintéticos que se caracterizan por poseer un anillo imidazólico que contiene 2 o 3 nitrógenos. Actúan inhibiendo la enzima 14- α demetilasa. Esta inhibición se produce al formarse un

complejo del azol con una parte del citocromo P-450 del hongo. El bloqueo de esta enzima impide la conversión de lanosterol en ergosterol, que es un componente fundamental de la membrana citoplasmática del hongo, y produce una alteración de la permeabilidad de la membrana y la acumulación de peróxidos que la dañan (Lumbreras *et al.*, 2003).

El fluconazol es un triazol que fue aprobado para su uso en la práctica clínica en 1990. Sus excelentes propiedades farmacocinéticas y su escasa toxicidad le han convertido en un fármaco excelente para la prevención y el tratamiento de la infección por *Candida* y *Cryptococcus* (Como y Dismukes, 1994).

Fluconazol es activo frente a levaduras. La mayoría de especies de *Candida spp.* son sensibles, aunque un buen número de cepas de *C. glabrata* son resistentes y *C. krusei* es intrínsecamente resistente. Es muy hidrosoluble y su absorción oral es muy rápida y completa (85-90%), no se ve modificada por la alimentación, la hipoclorhidria ni los tratamientos de la úlcera péptica. (Mellado *et al.*, 2002).

Una de las características más destacadas es la elevada penetración en los líquidos biológicos de todo el organismo. En el líquido cefalorraquídeo (LCR) de pacientes con meningitis se alcanzan niveles del 90% con respecto a los alcanzados en el suero. Se elimina principalmente por orina sin metabolizar, aunque en gran parte se reabsorbe en los túbulos renales. Un 10% se recupera en orina como glucurónido y el 2% en las heces, sin metabolizar. La insuficiencia renal altera de forma muy importante la excreción del fluconazol y obliga a reducir la dosis. (Lumbreras *et al.*, 2003).

6.7 Análisis genotípico

Los brotes de enfermedades infecciosas frecuentemente resultan de la exposición a la fuente del agente etiológico. Generalmente, el agente etiológico causante de un brote infeccioso deriva de una sola célula cuya progenie es genéticamente idéntica o muy parecida al organismo causal. En términos epidemiológicos, los organismos involucrados en un brote están emparentados, esto es que tienen un origen en común. Los organismos relacionados clonalmente son miembros de una misma especie, que a su vez comparten factores de virulencia, características bioquímicas y genómicas. Sin embargo, existe suficiente diversidad a nivel de especie para que los organismos aislados de diversos lugares, en diferentes tiempos y distintas regiones geográficas puedan ser diferenciados o clasificados dentro de subtipos o cepas.

El proceso de subtipificación es epidemiológicamente importante para reconocimiento de brotes de infección, detección de la transmisión de patógenos nosocomiales, determinación de la fuente de una infección, reconocimiento particular de cepas virulentas de organismos y la supervisión de programas de vacunación (Olive y Bean, 1999).

En la última década, se han desarrollado varios métodos para la identificación y tipificación de organismos eucariotas y procariotas a nivel de ADN. Estos métodos difieren en su poder discriminatorio, capacidad de rango taxonómico, reproducibilidad y la facilidad de interpretación y estandarización de cada uno de ellos. El método genotípico ideal debe producir resultados que sean invariables de laboratorio en laboratorio permitiendo análisis comparativos inequívocos y el establecimiento de bases de datos confiables.

Uno de los métodos prometedores es el análisis de Polimorfismos de Longitud de Fragmentos Amplificados (AFLP's), desarrollado por Keygene BV, Wageningen, Holanda (1995). Este método combina una aplicabilidad universal con un alto poder de discriminación y reproducibilidad. Un gran número de reportes describen el uso del análisis AFLP's para mapeo genético de plantas y animales, diagnóstico médico, estudios filogenéticos y tipificación microbiana (Savelkoul *et al.*, 1999).

La técnica de AFLP's esta basada en la amplificación selectiva por PCR de fragmentos de restricción de una digestión completa de ADN genómico. El análisis involucra 3 pasos: a) restricción del ADN y ligación de los adaptadores oligonucleótidos, b) amplificación selectiva de los diversos fragmentos de restricción y c) análisis en gel de los fragmentos amplificados. La amplificación por PCR de los fragmentos de restricción se logra usando los adaptadores y las secuencias de los sitios de restricción como sitios blanco para el alineamiento de los oligonucleótidos. La amplificación selectiva se alcanza por el uso de los oligonucleótidos que se extienden en los fragmentos de restricción, amplificando solo aquellos fragmentos en los cuales el *primer* reconoce los oligonucleótidos que flanquean los sitios de restricción.

Utilizando esta técnica pueden visualizarse diversos fragmentos de restricción por PCR sin conocimiento de la secuencia nucleotídica. Este método permite la co-amplificación selectiva de un gran número de fragmentos de restricción. Sin embargo, el número de fragmentos que pueden ser analizados simultáneamente depende de la resolución del sistema de detección. Generalmente se pueden amplificar y detectar de 50-100 fragmentos de restricción en geles de poliacrilamida.

El análisis de AFLP's representa una técnica nueva y muy poderosa de 'fingerprint' ADN para el análisis de ADNs de cualquier origen y complejidad (Vos *et al.*, 1995) y realizar análisis genotípico de diferentes poblaciones.

En este caso nos proveerá información respecto a las características de la población de cepas aisladas de casos clínicos de candidiasis en Monterrey, N.L.

7. MÉTODOS

7.1 Cepas de *C. albicans*

Se utilizaron 90 aislamientos de *C. albicans* provenientes de cuadros de vulvovaginitis y hemocultivos de pacientes del Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González” de la UANL, identificados por métodos microbiológicos (Identificación en agar Biggy y prueba de tubo germinativo) y bioquímicos (prueba API® 20 C AUX) en el Laboratorio de Micología del Centro Regional de Control de Enfermedades de la Facultad de Medicina (Tabla 1). Así mismo se incluyeron en el estudio 2 cepas de *Candida* no *albicans* (*C. parapsilosis* y *C. glabrata*) como controles externos. Como control de calidad se manejaron las cepas *C. albicans* ATCC 14053 (Thanos *et al.*, 1996) y *Candida* sp. ATCC 204276.

7.2 Caracterización de Susceptibilidad a Fluconazol de los Aislados de *C. albicans*

Los 94 aislamientos del proyecto fueron evaluados siguiendo la técnica de Drop Test (Gaxiola, 1992) con algunas modificaciones, determinando la susceptibilidad al fluconazol. Inicialmente se crece a saturación (1×10^8 cel/ml) en 1 ml de medio de cultivo caldo YPD (DIFCO) durante 48 h. Se preparan placas con medio de cultivo RPMI 1640 (Cellgro) a las cuales se les agrega el fármaco a una concentración de 8 y 64 $\mu\text{g/ml}$. Como control negativo se utilizan placas de RPMI 1640 sin fluconazol. Posteriormente se realizan 5 diluciones seriadas del cultivo inicial a un volumen final de 20 μl por dilución (2 μl de cultivo con 18 μl de agua bidestilada estéril, mezclando por pipeteo). Utilizar las últimas 4 diluciones (10^6 a 10^3), pipetear 5 μl de cada dilución e inocular en la placa de cultivo. Inocular 4 muestras por placa empezando por la dilución más baja (10^3). Una vez sembradas las cepas incubar a 37 °C por 48 h. Posteriormente interpretar los resultados de cada una de las concentraciones comparando con la placa control. El punto de corte se considera donde exista una inhibición del crecimiento mayor al 80%.

7.3 Extracción de ADN de los Aislados de *C. albicans*

La extracción de ADN se realizó de acuerdo con el protocolo modificado de Sambrook y Russell 2001, descrito brevemente. Inocular los cultivos de *C. albicans* en medio de cultivo caldo YPD (DIFCO) por 24 h. Transferir 1.5 ml de cultivo a un tubo de microcentrífuga y centrifugar a velocidad máxima por 1 min a temperatura ambiente. Remover el medio de cultivo por aspiración y resuspender el pellet en 500 µl de buffer STES (10mM Tris-HCl, 10mM EDTA, 50mM NaCl, 2% SDS) Agregar 1 volumen de perlas de vidrio y 200 µl de TE 1X (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA) pH 7.6 a cada tubo. Aplicar vórtex por 1 min. Posteriormente agregar 600 µl de fenol-cloroformo (1:1) y mezclar por inversión o vórtex rápido. Centrifugar a velocidad máxima por 10 min a 4 °C. Transferir la fase acuosa superior a un tubo nuevo y colectar el ADN por medio de una precipitación estándar con isopropanol 100% durante 20 min a -20 °C. Recuperar el precipitado de ADN centrifugando a velocidad máxima por 10 min a 4 °C. Remover el sobrenadante por aspiración y lavar el *pellet* de ADN con 200 µl de etanol 70%. De nuevo centrifugar durante 1 min a velocidad máxima a 4 °C. Finalmente remover el sobrenadante por aspiración y secar el *pellet* de ADN al aire por 15 minutos. Resuspender el *pellet* en 40 µl de TE 1X y agregar 5 µl de RNasa A (Invitrogen). Almacenar a 4 °C hasta su uso.

7.4 Cuantificación de ADN

La cuantificación del material genético se realizó por espectrofotometría con el espectrofotómetro ND-1000 (NanoDrop Technologies Inc., Wilmington, DE, EUA). Se prepararon moldes de ADN a una concentración establecida de 20 ng/µl, de acuerdo a especificaciones del fabricante requeridos para iniciar el protocolo de AFLP.

7.5 Análisis de Polimorfismos de Longitud de Fragmentos Amplificados (AFLP)

La generación de AFLP se desarrolló de acuerdo a Vos *et al.* (1995), utilizando el estuche comercial IRDye[®] Kit for Large Plant Genome Analysis de LI-COR[®] (LI-COR Biosciences, Lincoln, NE, EUA). Las etapas de digestión de ADN y ligación de adaptadores se llevaron de acuerdo con el protocolo incluido en el estuche comercial. La etapa de pre-amplificación se modificó al ajustar el volumen de reacción a 27 µl, debido a que en el protocolo original no está incluido el Cloruro de Magnesio (MgCl₂); la mezcla consistió de ADN digerido y ligado (2.5 µl), mezcla de preamplificación AFLP (20 µl), solución amortiguadora 10X (2.5 µl), MgCl₂ 50mM (1.5 µl) y *Taq* ADN

polimerasa 2.5 U (0.5 μ l). El programa térmico de incubación fue 20 ciclos a 94 °C por 30 s, 1 min a 56 °C y 1 min a 72 °C. El producto de preamplificación se diluyó a una concentración de 1:40. Para realizar la amplificación selectiva, se manejaron reacciones “monoplex” para el iniciador EcoR1-700 IRDyeTM conforme al protocolo del estuche comercial. La etapa de amplificación selectiva se modificó al ajustar los volúmenes de reacción; para la mezcla de *Taq* ADN polimerasa la mezcla consistió de agua desionizada (89.1 μ l), solución amortiguadora 10X (100mM Tris-HCl pH 8.3, 15mM MgCl₂, 500mM KCl) (39.6 μ l), dNTPs 10mM (6.6 μ l), *Taq* ADN polimerasa 9.5 U (1.9 μ l) y MgCl₂ 50mM (11.8 μ l) dando un total de 149 μ l de mezcla de *Taq* ADN polimerasa suficiente para 33 reacciones de amplificación selectiva. La amplificación selectiva consistió de ADN diluido y preamplificado (5 μ l), mezcla de *Taq* ADN polimerasa (4.5 μ l), iniciador MseI (0.5 μ l) e iniciador EcoR1-700 IRDyeTM (0.5 μ l) resultando en 10.5 μ l por reacción. El programa térmico para la amplificación selectiva fue el propuesto en el mismo protocolo.

La separación de los productos de amplificación se hizo por electroforesis en gel de poliacrilamida 6.5% en un secuenciador LI-COR[®] 4200 (Lincoln, NE, EUA).

7.6 Análisis Estadístico de los Datos de AFLPs

El análisis de identificación, presencias y ausencias de bandas se hizo con el programa SAGA^{MX} (LI-COR, Lincoln, NE, EUA). La presencia de patrones amplificados del marcador, fueron registradas como variables binarias, utilizando el número 1 para indicar la presencia de una banda y 0 para indicar su ausencia. Una vez analizadas las bandas presentes y ausentes se generaron varios perfiles de AFLP de un rango de 40 a 450 pares de bases las cuáles se exportaron a una matriz de datos de Excel[®].

Con la matriz de datos binarios se generaron los dendogramas para los materiales genéticos utilizando el programa bioinformático D-UPGMA usando el método de Jaccard.

8. RESULTADOS

8.1 Cepas de *C. albicans*

Tabla 1. Detalles de los aislados de *C. albicans* usados en el estudio.

Número de aislado	Origen	Edad del paciente	Sexo ^A	Número de aislado	Origen	Edad del paciente	Sexo ^A
CA1	Vulvovaginitis	23 años	F	CA25	Vulvovaginitis	39 años	F
CA2	Vulvovaginitis	18 años	F	CA26	Vulvovaginitis	17 años	F
CA3	Vulvovaginitis	53 años	F	CA27	Vulvovaginitis	25 años	F
CA4	Vulvovaginitis	44 años	F	CA28	Vulvovaginitis	35 años	F
CA5	Vulvovaginitis	18 años	F	CA29	Vulvovaginitis	38 años	F
CA6	Vulvovaginitis	19 años	F	CA30	Vulvovaginitis	22 años	F
CA7	Vulvovaginitis	21 años	F	CA31	Vulvovaginitis	36 años	F
CA8	Vulvovaginitis	24 años	F	CA32	Vulvovaginitis	42 años	F
CA9	Vulvovaginitis	32 años	F	CA33	Vulvovaginitis	28 años	F
CA10	Vulvovaginitis	33 años	F	CA34	Vulvovaginitis	41 años	F
CA11	Vulvovaginitis	37 años	F	CA35	Vulvovaginitis	19 años	F
CA12	Vulvovaginitis	18 años	F	CA36	Vulvovaginitis	24 años	F
CA13	Vulvovaginitis	23 años	F	CA37	Vulvovaginitis	28 años	F
CA14	Vulvovaginitis	25 años	F	CA38	Vulvovaginitis	35 años	F
CA15	Vulvovaginitis	29 años	F	CA39	Vulvovaginitis	27 años	F
CA16	Vulvovaginitis	37 años	F	CA40	Vulvovaginitis	38 años	F
CA17	Vulvovaginitis	28 años	F	CA41	Sangre	42 años	M
CA18	Vulvovaginitis	41 años	F	CA42	Sangre	56 años	M
CA19	Vulvovaginitis	35 años	F	CA43	Sangre	4 años	M
CA20	Vulvovaginitis	19 años	F	CA44	Sangre	68 años	F
CA21	Vulvovaginitis	21 años	F	CA45	Sangre	3 meses	M
CA22	Vulvovaginitis	24 años	F	CA46	Sangre	11 días	M
CA23	Vulvovaginitis	27 años	F	CA47	Sangre	3 meses	M
CA24	Vulvovaginitis	25 años	F	CA48	Sangre	2 años	M

Número de aislado	Origen	Edad del paciente	Sexo ^A	Número de aislado	Origen	Edad del paciente	Sexo ^A
CA49	Sangre	1 año	F	CA70	Sangre	59 años	F
CA50	Sangre	63 años	M	CA71	Sangre	3 meses	M
CA51	Sangre	34 años	M	CA72	Sangre	2 meses	M
CA52	Sangre	4 años	M	CA73	Sangre	67 años	F
CA53	Sangre	37 años	F	CA74	Sangre	48 años	F
CA54	Sangre	1 mes	M	CA75	Sangre	26 años	F
CA55	Sangre	37 años	F	CA76	Sangre	5 años	F
CA56	Sangre	56 años	M	CA77	Sangre	62 años	F
CA57	Sangre	2 años	F	CA78	Sangre	1 mes	F
CA58	Sangre	67 años	M	CA79	Sangre	2 meses	M
CA59	Sangre	30 años	M	CA80	Sangre	54 años	M
CA60	Sangre	63 años	M	CA81	Sangre	37 años	F
CA61	Sangre	5 años	M	CA82	Sangre	2 años	M
CA62	Sangre	1 mes	M	CA83	Sangre	4 años	F
CA63	Sangre	35 años	M	CA84	Sangre	1 mes	F
CA64	Sangre	2 meses	M	CA85	Sangre	2 años	M
CA65	Sangre	60 años	M	CA86	Sangre	78 años	M
CA66	Sangre	50 años	M	CA87	Sangre	1 mes	M
CA67	Sangre	2 años	F	CA88	Sangre	22 años	F
CA68	Sangre	31 años	M	CA97	Sangre	2 meses	F
CA69	Sangre	43 años	M	CA98	Sangre	3 meses	F

^A Sexo M= masculino, F= femenino.

8.2 Susceptibilidad a Fluconazol de los Aislados Mediante la Técnica de Drop Test

El ensayo de susceptibilidad a fluconazol por medio de drop test, que se realizó a las cepas de *C. albicans* obtenidas a partir de aislados clínicos generó 3 tipos diferentes de resultados: 1) Resistente, este es la cepa la cual es capaz de reportar crecimiento en todos los tamaños de inóculo usadas, en ambas concentraciones de fluconazol a 8 y 64 µg/ml. 2) Susceptibles dependientes de dosis, toda aquella cepa que no lograba desarrollarse en el mínimo tamaño de inóculo a la máxima concentración de fármaco, pero si en las demás concentraciones de inóculo y fármaco. 3) Susceptible, estas fueron las cepas que no lograron crecimiento en el mínimo tamaño de inóculo en la concentración de 8 µg/ml. En la Tabla 2 se muestran los resultados obtenidos en las 94 muestras evaluadas; se probaron 2 concentraciones del fármaco fluconazol, 8 y 64

$\mu\text{g/ml}$, además de la placa control (sin fármaco). Aquellas cepas que presentaron crecimiento en las 4 concentraciones celulares de la concentración de $8 \mu\text{g/ml}$ pasaban automáticamente a la concentración de $64 \mu\text{g/ml}$.

Los valores de concentración inhibitoria para la prueba de drop test se interpretaron como la concentración a la cual al menos la alícuota correspondiente a 10^3 células mostró una disminución del 80% en el crecimiento en comparación a la placa control sin fármaco (Fig 3).

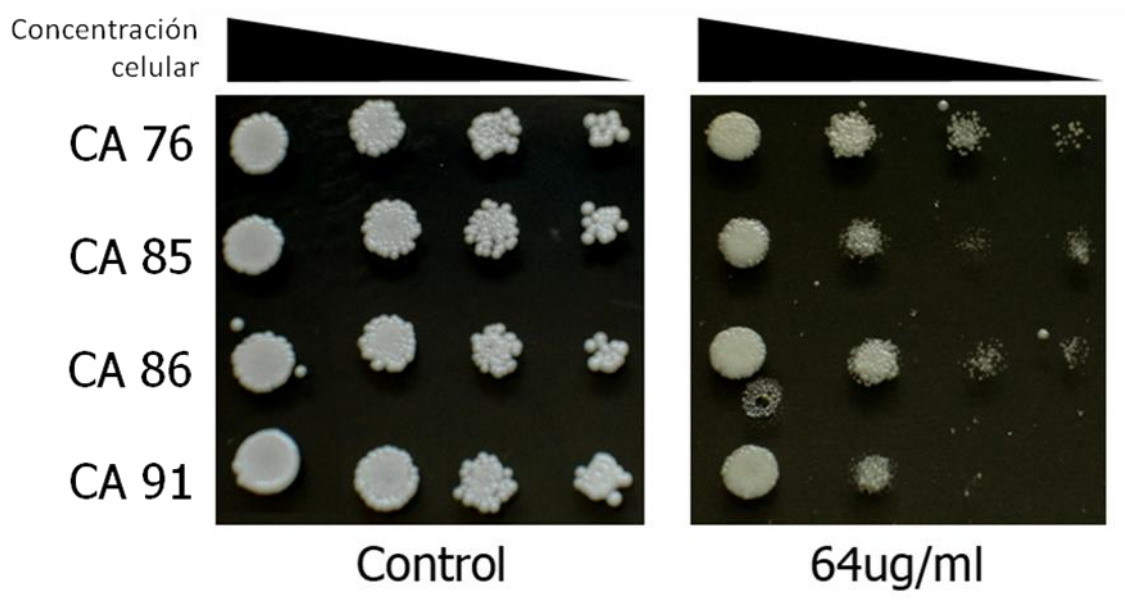


Figura 3. Resultados de Drop Test de las cepas CA76, CA85, CA86, CA91 a las concentraciones de 10^6 , 10^5 , 10^4 y 10^3 ; las cuáles se consideran SDD^a ya que la concentración de 10^3 de las 4 muestras presenta una disminución mayor al 80% en comparación con la placa control. De izquierda a derecha, mayor > menor concentración celular. ^a SDD= susceptible dependiente de dosis.

Tabla 2. Clasificación de crecimiento de las 94 muestras de acuerdo a la Técnica de Drop Test.

Placa	Control (sin fármaco)				FLU 8 µg/ml				FLU 64 µg/ml			
Concentración celular	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴	10 ³
Cepas												
CA1	+	+	+	+	+							
CA2	+	+	+	+	+							
CA3	+	+	+	+	+							
CA4	+	+	+	+	+							
CA5	+	+	+	+	+	+	+					
CA6	+	+	+	+	+							
CA7	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CA8	+	+	+	+	-	-	-	-				
CA9	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CA10	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CA11	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CA12	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CA13	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CA14	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CA15	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CA16	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CA17	+	+	+	+	+	+						
CA18	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
CA19	+	+	+	+	-	-	-	-				
CA20	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
CA21	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
CA22	+	+	+	+	+							
CA23	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CA24	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CA25	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
CA26	+	+	+	+	+	+						
CA27	+	+	+	+	+							
CA28	+	+	+	+	+	+	+					
CA29	+	+	+	+	+							
CA30	+	+	+	+	-	-	-	-				
CA31	+	+	+	+	-	-	-	-				
CA32	+	+	+	+	-	-	-	-				

Placa	Control (sin fármaco)				FLU 8 µg/ml				FLU 64 µg/ml			
Concentración celular	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴	10 ³
Cepas												
CA33	+	+	+	+	-	-	-	-				
CA34	+	+	+	+	+	+	+	+	+			
CA35	+	+	+	+	-	-	-	-				
CA36	+	+	+	+	-	-	-	-				
CA37	+	+	+	+	+							
CA38	-	-	-	-	-	-	-	-				
CA39	+	+	+	+	-	-	-	-				
CA40	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CA41	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CA42	+	+	+	+	+	+	+					
CA43	+	+	+	+	+	+	+	+	+			
CA44	+	+	+	+	+	+	+	+	+			
CA45	+	+	+	+	+	+	+	+	+			
CA46	+	+	+	+	+	+	+					
CA47	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
CA48	+	+	+	+	-	-	-	-				
CA49	+	+	+	+	-	-	-	-				
CA50	+	+	+	+	+	+	+					
CA51	+	+	+	+	+	+	+					
CA52	+	+	+	+	+	+						
CA53	+	+	+	+	+	+	+					
CA54	+	+	+	+	+	+						
CA55	+	+	+	+	+							
CA56	+	+	+	+	-	-	-	-				
CA57	+	+	+	+	-	-	-	-				
CA58	+	+	+	+	+	+	+					
CA59	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
CA60	+	+	+		-	-	-	-				
CA61	+	+	+	+	+							
CA62	+	+	+	+	+	+	+					
CA63	+	+	+	+	+	+	+					
CA64	+	+	+	+	+	+	+					
CA65	+	+	+	+	+	+	+					
CA66	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CA67	+	+	+	+	+	+						

Placa	Control (sin fármaco)				FLU 8 µg/ml				FLU 64 µg/ml			
Concentración celular	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴	10 ³
Cepas												
CA68	+	+	+	+	+	+	+					
CA69	+	+	+	+	+							
CA70	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CA71	+	+	+	+	+	+	+					
CA72	+	+	+	+	+	+						
CA73	+	+	+	+	+	+						
CA74	+	+	+	+	+	+						
CA75	+	+	+	+	+	+						
CA76	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
CA77	+	+	+	+	+	+	+					
CA78	+	+	+	+	+	+						
CA79	+	+	+	+	+	+						
CA80	+	+	+	+	+							
CA81	+	+	+	+	-	-	-	-				
CA82	+	+	+	+	-	-	-	-				
CA83	+	+	+	+	-	-	-	-				
CA84	+	+	+	+	+							
CA85	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
CA86	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
CA87	+	+	+	+	+	+						
CA88	+	+	+	+	+	+	+					
CA89	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CA90	+	+	+	+	-	-	-	-				
CA91	+	+	+	+		-	-	-				
CA92	+	+	+	+	-	-	-	-				

Interpretación de los signos: + crecimiento; - no crecimiento. FLU: fluconazol.

De acuerdo a los criterios establecidos y en base a los resultados de la Tabla 2 se obtuvieron 16 cepas resistentes (CA7, CA9, CA10, CA11, CA12, CA13, CA14, CA15, CA16, CA23, CA24, CA40, CA41, CA66, CA70, CA89), 13 susceptibles dependientes de dosis (CA18, CA20, CA21, CA25, CA34, CA43, CA44, CA45, CA47, CA59, CA76, CA85, CA86) y 65 como susceptibles (cepas restantes).

8.3 Extracción de ADN Genómico Total

8.3.1 Estandarización de la técnica

Se logró estandarizar el protocolo descrito por Sambrook y Russell 2001, se realizó la extracción de las 94 cepas obteniendo ADN genómico de alta calidad, logrando así estar en el rango óptimo para ser utilizado en múltiples técnicas de biología molecular incluyendo AFLPs (Fig. 4).

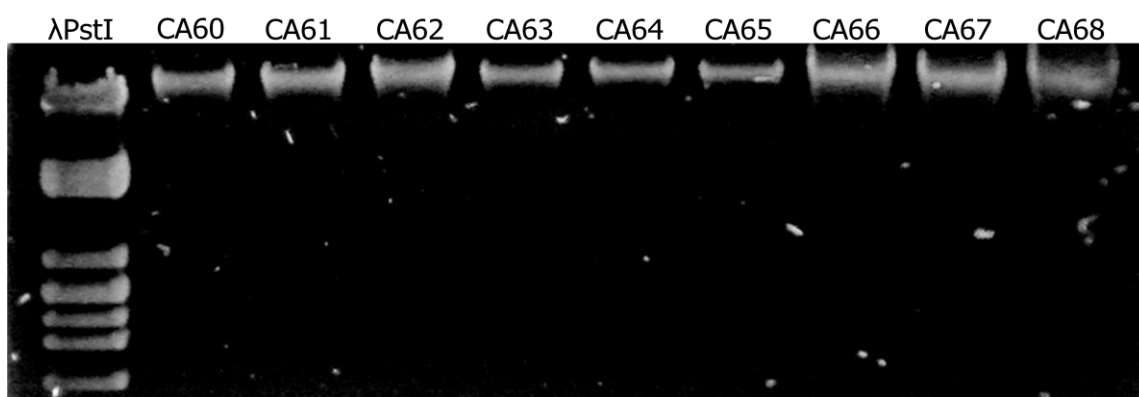


Figura 4. Electroforesis de ADN extraído de levaduras en gel de agarosa al 1.2% teñido con bromuro de etidio. Marcador: λ PstI; Cepas: CA60-CA68.

8.3.2 Cuantificación de ADN

Se prepararon moldes de ADN genómico para la realización de los ensayos de AFLP, para lo cual se realizaron lecturas de concentración por medio de un espectrofotómetro modelo NanoDrop ND-1000 (Tabla 3), comprobando también la calidad y la pureza del material genético. Una vez conocidas las concentraciones iniciales se realizaron diluciones de ADN para obtener una concentración final de 20 ng/ μ l, lo cual fue confirmado nuevamente por espectrofotometría (Tabla 4).

Tabla 3. Determinación de la concentración de ADN en ng/μl de las muestras CA1 a la CA11.

Sample ID	ng/μl	A260	A280	260/280	260/230
CA1	93.23	1.865	1.098	1.7	1.95
CA2	272.6	5.452	3.006	1.81	2.29
CA3	406.31	8.126	4.233	1.92	2.4
CA4	1042.82	20.856	10.44	2	2.43
CA5	383.39	7.668	4.061	1.89	2.17
CA6	373.96	7.479	4.022	1.86	2.22
CA8	626.52	12.53	6.35	1.97	2.33
CA9	1080.33	21.607	10.947	1.97	2.62
CA10	1884.98	37.7	19.471	1.94	2.53
CA11	730.21	14.604	7.833	1.86	2.46

Tabla 4. Verificación de Moldes de ADN tomados al azar a una concentración promedio de 20 ng/μl.

Sample ID	ng/μl	A260	A280	260/280	260/230
CA5	18.11	0.362	0.212	1.71	2.13
CA9	21.84	0.437	0.245	1.79	2.45
CA13	20.76	0.415	0.247	1.68	2.76
CA17	18.98	0.38	0.217	1.75	2.52
CA22	25.31	0.506	0.288	1.76	2.3
CA26	23.62	0.472	0.261	1.81	0.54
CA30	20.28	0.406	0.204	1.99	2.88
CA31	16.43	0.329	0.16	2.05	1.07
CA35	27.57	0.551	0.312	1.77	3.07

8.3.3 Control de Calidad de Moldes de ADN

Una vez preparadas las diluciones de ADN antes mencionadas, se verificó el estado del mismo mediante PCR para confirmar la calidad, utilizando una temperatura inicial de desnaturalización de 95°C durante 5 min, para después pasar por 29 ciclos en donde la desnaturalización se realiza a 95°C por 30 segundos, el alineamiento a 55°C por 1 minuto y la polimerización a 72°C por 1 minuto 20 segundos (Fig. 5).

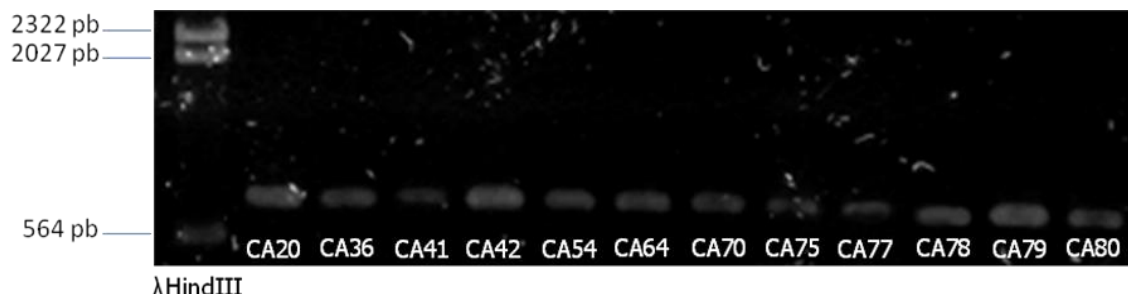


Figura 5. Tinción con bromuro de etidio de cepas de *C. albicans* con una concentración establecida de 20 ng/μl en gel de agarosa al 1.2%. Marcador: λHindIII.

8.4 Análisis de Polimorfismos de Aislados de *C. albicans* Mediante AFLP

Las secuencias de los adaptadores y de los oligonucleótidos usados para el análisis de AFLP se muestran en la Tabla 5. La Figura 6 muestra el resultado de los geles de poliacrilamida obtenidos posteriormente a los ensayos AFLP. Los carriles laterales del gel fueron cargados con un marcador estándar de 50-700 pares de bases. Para la realización de éste se utilizaron volúmenes de 0.5 μl para todas las muestras así como para el marcador. La concentración del gel fue de 6.5% en poliacrilamida. Los rangos de tamaño obtenidos van desde los 40 hasta los 450 pares de bases, generándose un total de 153 bandas. La presencia o ausencia de las diferentes bandas crea diversos patrones, los cuáles varían dependiendo de la secuencia genética de los organismos, base en la cual se sujeta la elaboración de dendogramas que se describe más adelante.

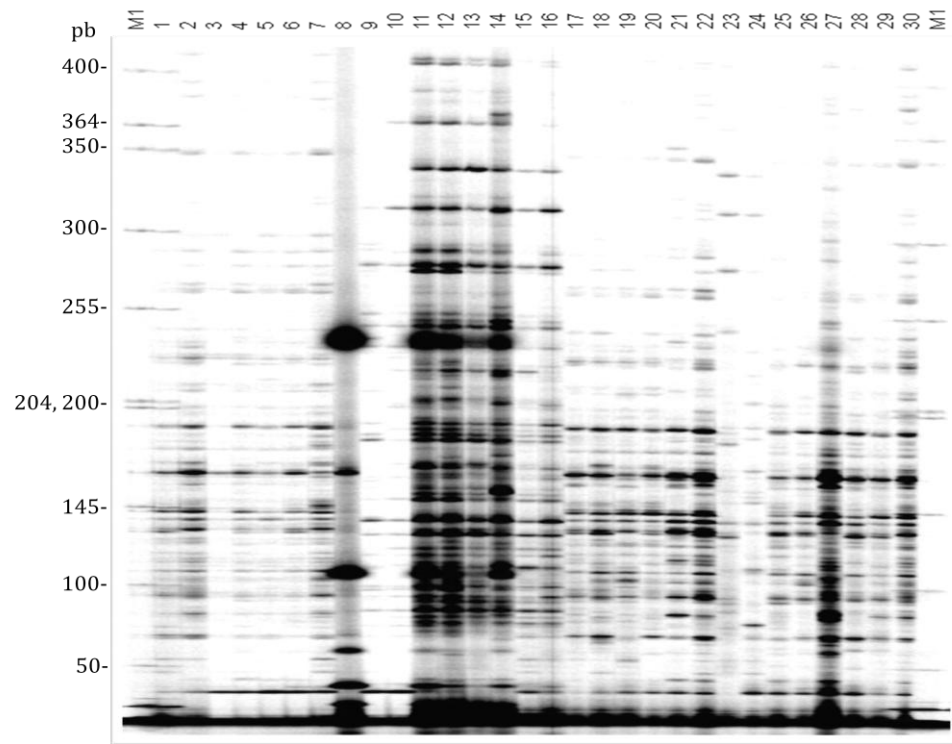
Tabla 5. Secuencias de los adaptadores y oligonucleótidos usados en el estudio.

Oligonucleótidos o adaptadores	Secuencia (5' a 3')
Ada1EcoRI	CTCGTAGACTGCGTACC
Ada2EcoRI	AATTGGTACGCAGTCTAC
Ada1MseI	GACGATGAGTCCTGAG
Ada2MseI	TACTCAGGACTCATC
OligoEcoRI	GACTGCGTACCAATTC
OligoEcoRIAC ^a	*GACTGCGTACCAATTCAC ^a
OligoMseI	GATGAGTCCTGAGTAA
OligoMseIC ^a	GATGAGTCCTGAGTAAC ^a

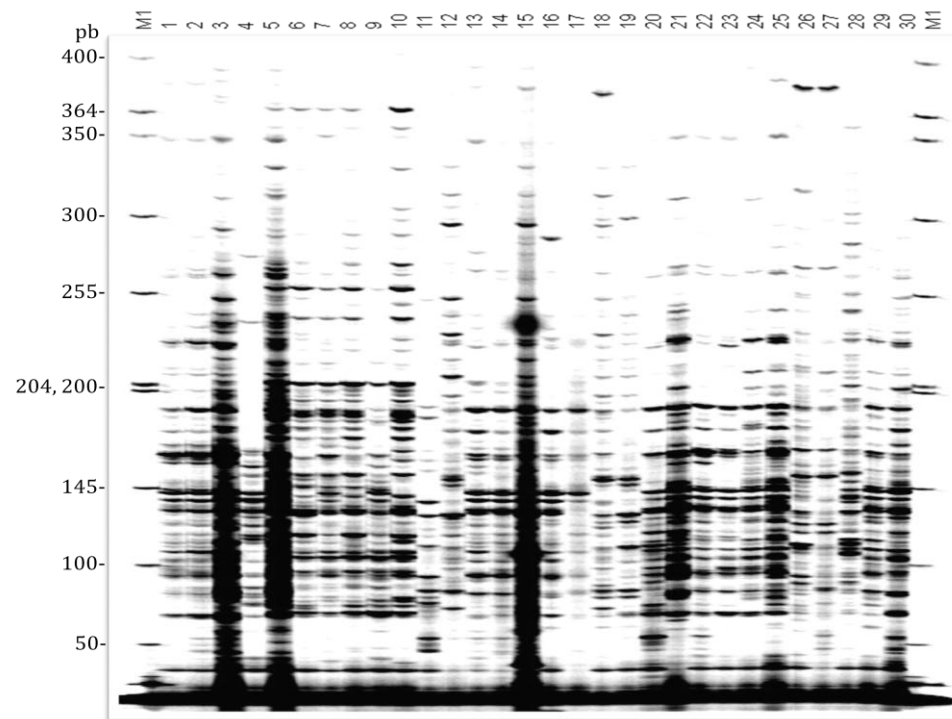
^a Las letras en negritas representan los nucleótidos adicionales en los oligonucleótidos del PCR selectivo.

* Oligonucleótidos marcados con el fluoróforo

A



B



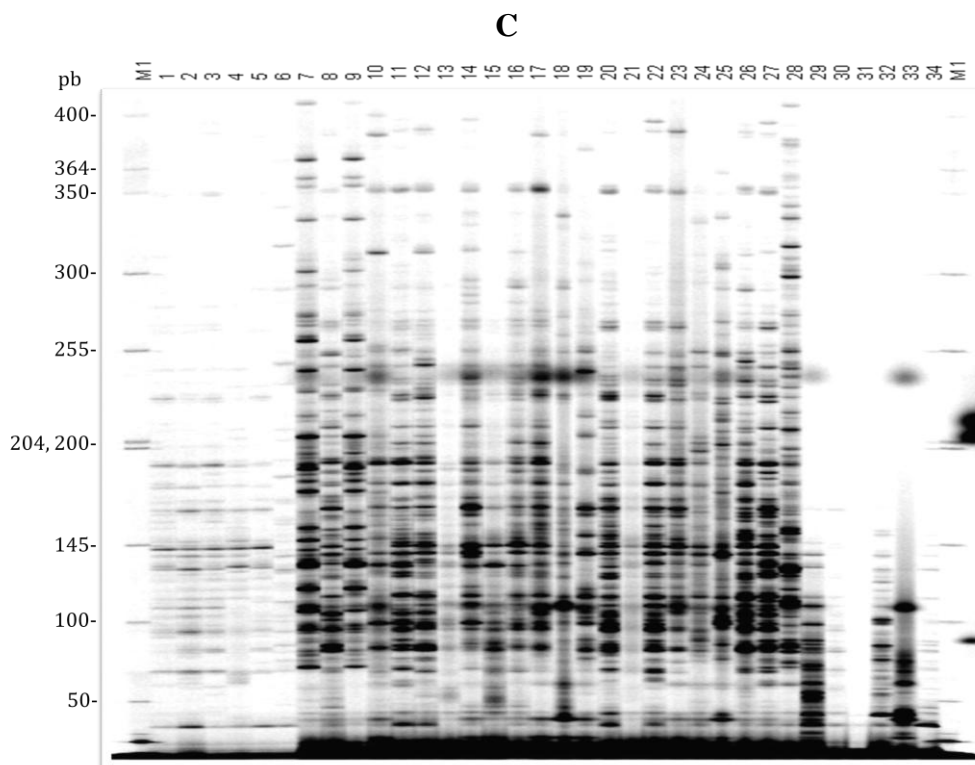


Figura 6. Perfiles de AFLP obtenidos a partir de 90 aislados clínicos de *C. albicans* y 4 cepas de referencia. Panel A: líneas 1-30 (CA1-CA30). Panel B: líneas 1-30 (CA31-CA60). Panel C: líneas 1-28 (CA61-CA88); líneas 29 y 30 (CA97, CA98); línea 31 (CA89 *C. albicans* ATCC 14053); línea 32 (CA90 *Candida* sp. ATCC 204276); línea 33 (CA91 *C. parapsilosis*); línea 34 (CA92 *C. glabrata*). Línea M1, marcador de peso molecular de 50-700 pares de bases.

La metodología de AFLP generó 153 bandas cuantificables por medio del programa SAGA^{MX} (LI-COR, Lincoln, NE, EUA). De las cuáles, 152 son bandas polimórficas (99.3%), es decir, ausentes en al menos 3 aislados y una sola banda fue monomórfica (402 pb).

8.5 Elaboración del Dendograma

Una vez realizada la matriz de datos binarios en Excel[®] se utilizó el programa bioinformático en línea D-UPGMA (García-Vallve *et al.*, 1999; <http://genomes.urv.cat/UPGMA/>). El archivo es interpretado como un juego de variables de las cuáles el programa calcula una matriz de similitud para finalmente crear un dendograma. Se utilizó el coeficiente de Jaccard (Tanimoto) para comparar el juego de variables y se generó un *bootstrap* de 100 réplicas, resultando el árbol que se muestra en la Figura 7.

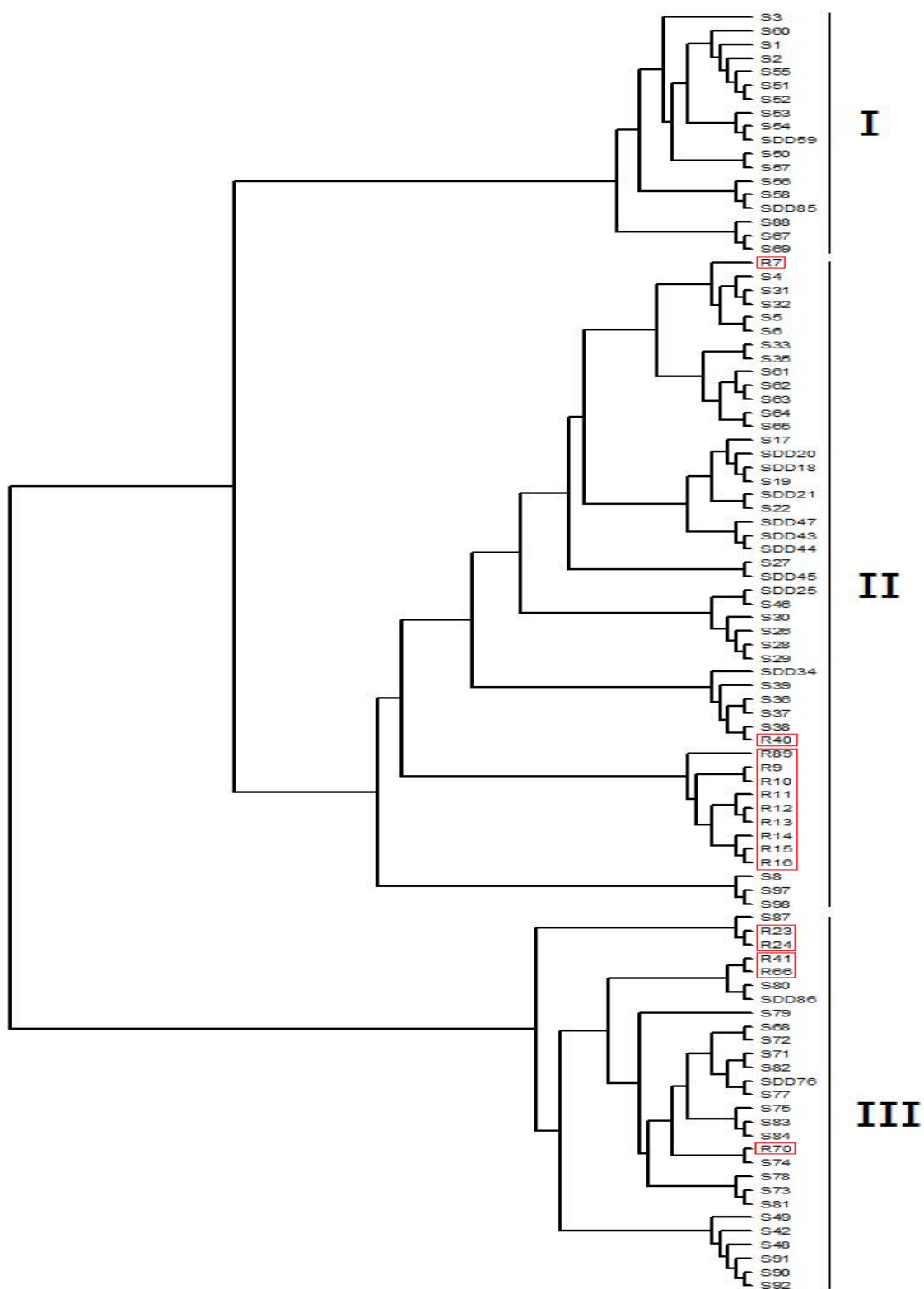


Figura 7. Dendrograma de los 94 aislados clínicos de *C. albicans* del Hospital Universitario. Se elaboró usando los programas D-UPGMA y TreeView considerando únicamente las bandas polimórficas. En recuadros rojos se resaltan las cepas resistentes.

Se logran identificar 3 grupos principales (I, II y III), dentro del grupo II se agruparon en una misma rama 9 de los 16 aislados identificados como resistentes, las cepas CA9, CA10, CA11, CA12, CA13, CA14, CA15, CA16 y la CA89. La cepa CA40 y CA7 también clasificadas como resistentes, se encuentran en el mismo grupo pero en ramas distintas. Así mismo se observa que el grupo II es el más abundante ya que engloba el mayor número de cepas. También se determinó que en base al árbol formado, el grupo I y II poseen un ancestro común más cercano que con el grupo III. Al analizar la matriz de datos se observó que las cepas CA9 a la CA16 comparten entre ellas 5 bandas que son la 41, 82, 101, 121 y 127 (281, 183, 138, 100 y 85 pb respectivamente). La cepa CA89 comparte únicamente 3 bandas con este grupo, la 101, 121 y 127. La cepa CA7 comparte solo la banda 101 y la CA40 es positiva para la banda 82.

En cuanto al resto de las cepas resistentes CA23, CA24, CA41, CA66 y CA70, éstas se encuentran en el grupo III, algunas presentan una de las 5 bandas del clado de resistentes (grupo II, CA9-CA16, CA89); la CA24 presenta la 101 y la CA23 la banda 127. De éstas 5 cepas la CA23-CA24 se muestran juntas en una misma rama al igual que la CA41 y CA66. Las cepas no-albicans, CA91 y CA92 (*C. parapsilosis* y *C. glabrata*, respectivamente) se incluyeron en el grupo III.

9. DISCUSIÓN

Este estudio provee un avance sobre la epidemiología molecular de *C. albicans* en la zona metropolitana de Monterrey. El escaneo molecular de las muestras incluyó una población de 90 aislados clínicos de *C. albicans* de origen genital (vulvovaginitis) y hematológico (sangre) provenientes del Laboratorio de Micología del Centro Regional de Control de Enfermedades del Hospital Universitario, UANL. También se incluyeron 4 cepas como controles externos, la cepa *C. albicans* ATCC 14053 (CA89), *Candida* sp. ATCC 204276 (CA90), una cepa de *C. parapsilosis* (CA91) y una *C. glabrata* (CA92).

Se llevó a cabo la determinación de la susceptibilidad al antifúngico fluconazol para las 94 muestras mediante la técnica de Drop Test descrita por Gaxiola *et al.* 1992, originalmente utilizada para determinar la tolerancia a sales en levaduras, dicha técnica se empleo recientemente en un estudio comparativo con 2 metodologías destinadas a la susceptibilidad a antifúngicos (Robledo *et al.*, 2010; datos aun no publicados). En el presente trabajo, 65 % de los aislados se comportaron como sensibles, 14 % como SDD y 17 % resistentes al fluconazol. Messer *et al.*, en el 2006 recopiló 1397 aislados de *Candida* durante el programa de vigilancia antimicrobiana SENTRY del 2003 encontrando que la población presentó un 88.5% susceptibles, 7.3% SDD y un 4.2% como resistentes, en nuestro estudio el porcentaje de susceptible dependiente de dosis y resistente fue más alto.

Una vez conocidos los patrones de susceptibilidad se procedió a la extracción del material genético de los aislados, siguiendo el protocolo de Sambrook y Russel, 2001. Para realizar la metodología de AFLP se requirió conocer la cantidad de ADN de los aislados y elaborar los llamados “moldes” de ADN. Esto es una cepa con una cantidad determinada de ácido nucleico que en nuestro caso se fijó a una concentración de 20 ng/μl, necesario para iniciar el AFLP. Así mismo se determinó la pureza del ADN. El uso de ADN con alta pureza es obligatorio para prevenir variaciones en los perfiles de AFLP (ADN impuro lleva a tener patrones incompletos de AFLP) y el uso de cepas de referencia y marcadores moleculares facilita la comparación de los perfiles entre laboratorios (Tavanti *et al.*, 2007).

Las técnicas moleculares han demostrado ser útiles para la identificación de levaduras en el ámbito clínico y como es esperado, el análisis por AFLP ha probado ser mas discriminativo que la identificación fenotípica convencional para las especies de *Candida* (Ball *et al.*, 2004). La tipificación epidemiológica para identificar la fuente y las relaciones clonales de los aislados en situaciones epidémicas y brotes nosocomiales es importante en las estrategias de control y prevención. Los métodos genotípicos

representan una importante ventaja en la tipificación de microorganismos tales como *Candida* que son difíciles de tipificar con métodos fenotípicos (Marol y Yucesoy, 2007).

En el AFLP se emplearon las enzimas EcoRI y MseI, después se agregaron los adaptadores reconociendo la secuencia de corte de las enzimas. De acuerdo a Borst *et al.*, 2003 y Tavanti *et al.*, 2007, se realizó el primer PCR con los oligonucleótidos EcoRI y MseI sin ningún nucleótido extra; en el segundo PCR se agregaron 2 nucleótidos (EcoRIAC) y un nucleótido selectivo (MseIC) respectivamente. Una de las ventajas del análisis AFLP es que es un método basado en la ligación de secuencias conocidas (adaptadores) a los fragmentos de restricción, que funcionan como secuencias blanco para los oligonucleótidos del PCR, por lo tanto, la técnica es universalmente aplicable (Borst *et al.*, 2003). Se corrieron geles y se fotografiaron, los resultados se interpretaron como la presencia o ausencia de las diversas bandas de acuerdo a su peso molecular. Las imágenes se analizaron con el programa SAGA^{MX}. Se generaron 153 bandas, comprendiendo un rango de 40 a 500 pares de bases donde el 99.3% de las bandas fueron polimórficas. Para el análisis estadístico se empleó el programa en línea D-UPGMA con el cual se elaboró el dendograma de los 94 aislados clínicos. El dendograma muestra una distribución en 3 clados o grupos (I, II, III) de las cepas de trabajo. En el grupo II se asociaron en una misma rama del árbol 9 de las 16 cepas referidas como resistentes (CA9, CA10, CA11, CA12, CA13, CA14, CA15, CA16 y CA89). La cepa CA7 y CA40 también se agruparon en el clado II pero en distintas ramas. El resto de las cepas resistentes, CA23, CA24, CA41, CA66 y CA70, se posicionaron en el grupo III. Cabe resaltar que las cepas control CA90, CA91 y CA92 que son *Candida* sp. ATCC 204276, *C. parapsilosis* y *C. glabrata* respectivamente, se mantuvieron en una misma rama del grupo III.

Al analizar estos 9 aislados, se observó que comparten entre sí 5 bandas que son la 41, 82, 101, 121 y 127 (281, 183, 138, 100 y 85 pb respectivamente). La muestra CA89 comparte sólo 3 de las 5 bandas, la 101, 121 y 127. Esto podría indicar que éstas bandas pueden ser determinantes de los factores que confieren resistencia a fármacos y pueden ser posibles enfoques para futuros estudios con éste grupo en particular. El uso del análisis de AFLP puede proveer valiosas señales en la identificación de patógenos fúngicos. La técnica tiene un alto grado de flexibilidad y el procedimiento es fácil de realizar. Teóricamente un resultado puede ser obtenido en 8 horas. Otra ventaja es el potencial para automatizar virtualmente todo el proceso. Las desventajas son que depende de un software caro y que los perfiles obtenidos no son tan fácilmente intercambiables entre distintos laboratorios ya que se requiere una uniformidad en cuanto a los equipos utilizados, para esto tendría que llevarse a cabo una estandarización de la técnica. Actualmente, la parte económica y la experiencia requerida probablemente puedan limitar la aplicación como una técnica de rutina en el ambiente clínico. Sin embargo, el análisis por AFLP de especies médicamente importantes de *Candida* es una robusta herramienta de investigación epidemiológica (Ball *et al.*, 2004).

En el presente trabajo se determinó que el resultado de susceptibilidad a un fármaco y la metodología AFLP para identificar aislados clínicos se relacionaron si no del todo, en parte, en cuanto al grupo de aislados pertenecientes al clado II del dendograma

identificados como resistentes. Se sugiere la necesidad de más estudios locales sobre el tema, una opción sería enfocarse en la naturaleza de las bandas compartidas.

10. CONCLUSIONES

Se caracterizó la variabilidad genética de aislados clínicos de *C. albicans* provenientes de cuadros de vulvovaginitis y de cavidad cerrada estéril (hemocultivos) en la ciudad de Monterrey, generando una clasificación por medio de Drop Test de 16 cepas resistentes, 13 cepas susceptibles dependientes de dosis y 65 susceptibles.

Se logró estandarizar el protocolo de extracción de ácidos nucleicos de Sambrook y Russell para éstas levaduras y se cuantificaron las muestras de ADN por medio del espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 obteniéndose buena cantidad y pureza.

Se determinó mediante la técnica de AFLP la variabilidad de los aislados clínicos de *C. albicans* generándose un dendograma donde se agruparon en 3 clados.

En el grupo I se concentraron cepas susceptibles y susceptibles dependientes de dosis. En el grupo II se encontraron 9 (CA9, CA10, CA11, CA12, CA13, CA14, CA15, CA16, CA89) de las 16 cepas resistentes en una misma rama del grupo y otras 2 cepas resistentes (CA7, CA40) dispersas en el clado. Finalmente en el grupo III se localizaron el resto de las cepas resistentes (CA23, CA24, CA41, CA66, CA70) y también las cepas control (CA90, CA91, CA92).

De estas 9 muestras, 8 comparten la cantidad de 5 bandas las cuáles pueden ser la base para futuros estudios. El resto de los aislados resistentes que no se agruparon pueden tener un origen distinto o presentar bandas diferentes que pudieran estar asociadas a resistencia. Con lo que podemos concluir que puede existir una relación entre la susceptibilidad a un fármaco y la huella genética de *C. albicans*.

Se realizó la técnica de AFLP reconociendo los distintos patrones moleculares y se determinó que esta técnica puede diferenciar, en parte, entre especies resistentes y susceptibles a fluconazol.

11. LITERATURA CITADA

Akpan A; Morgan R. 2002. Oral candidiasis. *Postgrad Med J* 78:455-459.

Alexander BD; Byrne TC; Smith KL; Hanson KE; Anstrom KJ; Perfect JR; Reller LB. 2007. Comparative evaluation of Etest and Sensititre YeastOne panels against the clinical and laboratory standards institute M27-A2 reference broth microdilution method for testing *Candida* susceptibility to seven antifungal agents. *J Clin Microbiol* 45:698-706.

Arnaud MB; Costanzo MC; Skrzypek MS; Binkley G; Lane C; Miyasato SR; Sherlock G. 2005. The *Candida* Genome Database (CGD), a community resource for *Candida albicans* gene and protein information. *Nucleic Acids Research* Vol. 33

Ball LM; Bes MA; Theelen B; Boekhout T; Egeler RM; Kuijper EJ. 2004. Significance of amplified fragment length polymorphism in identification and epidemiological examination of *Candida* species colonization in children undergoing allogeneic stem cell transplantation. *J Clin Microbiol* 42:1673-1679.

Bial-Arístegui. 2002. *Candida albicans* (Robin) Berkhout. *Rev Iberoam Micol* 25-26.

Borst A; Theelen B; Reinders E; Boekhout T; Fluit AC; Savelkoul PHM. 2003. Use of amplified fragment length polymorphism analysis to identify medically important *Candida spp.*, including *C. dubliniensis*. *J Clin Microbiol* 41:1357-1362.

Bouza E; Muñoz P. 2008. Epidemiology of candidemia in intensive care units. *Int J Antimicrob Agents* 32:87-91.

Butler G; Rasmussen MD; Lin MF; Santos MA; Sakthikumar S; Munro CA; Rheinbay E; Grabherr M; Forche A; Reedy JL; Agrafioti I; Arnaud MB; Bates S; Brown AJ; Brunke S; Costanzo MC; Fitzpatrick DA; de Groot PW; Harris D; Hoyer LL; Hube B; Klis FM; Kodira C; Lennard N; Loque ME; Martin R; Neiman AM; Nikolaou E; Quail MA; Quinn J; Santos MC; Schmitzberger FF; Sherlock G; Shah P; Silverstein KA; Skrzypek MS; Soll D; Staggs R; Stansfield I; Stumpf MP; Sudbery PE; Srikantha T; Zeng Q; Berman J; Berriman M; Heitman J; Gow NA; Lorenz MC; Birren BW; Kellis M; Cuomo CA. 2009. Evolution of pathogenicity and sexual reproduction in eight *Candida* genomes. *Nature* 459:657-62.

Cannon RD; Lamping E; Holmes AR; Niimi K; Tanabe K; Niimi M; Monk BC. 2007. *Candida albicans* drug resistance-another way to cope with stress. *Microbiology* 153:3211-3217.

Casalinuovo IA; Di Francesco P; Garaci E. 2004. Fluconazole resistance in *Candida albicans*: a review of mechanisms. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 8:69-77.

Chaffin WL. 2008. *Candida albicans* cell wall proteins. *Microbiol Mol Biol Rev* 72:495-544.

Chong PP; Hadi SRA; Lee YL; Phan CL; Tan BC; Ng KP; Seow HF. 2007. Genotyping and drug resistance profile of *Candida* spp. in recurrent and one-off vaginitis, and high association of non-albicans species with non-pregnant status. *Infection, Genetics and Evolution* 7:449-456.

CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). 2008. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; approved standard-third edition. CLSI document M27-A3 (ISBN 1-56238-666-2). CLSI, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA.

CLSI. 2009. Method for antifungal disk diffusion susceptibility testing of yeasts; approved guideline-second edition. CLSI document M44-A2 (ISBN 1-56238-703-0). CLSI, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA.

Coleman JJ; Mylonakis E. 2009. Efflux in Fungi: la piece de resistance. *PLoS Pathog* 5(6).

Como JA; Dismukes WE. 1994. Oral azole drugs as systemic antifungal therapy. *N Engl J Med* 330:263-72.

Coste A; Selmecki A; Forche A; Diogo D; Bougnoux ME; dEnfert C; Berman J; Sanglard D. 2007. Genotypic evolution of azole resistance mechanisms in sequential *Candida albicans* isolates. *Eukaryotic Cell* 6:1889-1904.

Cowen LE. 2008. The evolution of fungal drug resistance: modulating the trajectory from genotype to phenotype. *Nat Rev Microbiol* 6:187-98.

De Repentigny L; Lewandowski D; Jolicoeur P. 2004. Immunopathogenesis of oropharyngeal candidiasis in human immunodeficiency virus infection. *Clin Microbiol Rev* 17:729-759.

De Rosa FG; Garazzino S; Pasero D; Di Perri G; Ranieri VM. 2009. Invasive candidiasis and candidemia: new guidelines. *Minerva Anestesiol* 75:1-6.

Dismukes WE; Pappas PG; Sobel JD. 2003. *Clinical Mycology*. Oxford University Press, Inc. pp. 143-175.

Dongari-Bagtzoglou A; Dwivedi P; Ioannidou E; Shaqman M; Hull D; Burleson J. 2009. Oral *Candida* infection and colonization in solid organ transplant recipients. *Oral Microbiol Immunol* 24:249-254.

Duerr A; Sierra M; Clarke L; Landesman S; Ehrlich I; Minkoff H. 1993. Vaginal candidiasis among HIV-infected women. In: Proceedings of the IXth International Conference on AIDS, Berlin, Germany, Jun 6-11.

Dunkel N; Liu TT; Barker KS; Homayouni R; Morschhauser J; Rogers PD. 2008. A gain of function mutation in the transcription factor Upc2p causes upregulation of ergosterol biosynthesis genes and increased fluconazole resistance in a clinical *Candida albicans* isolate. *Eukaryotic Cell* 7:1180-1190.

Dunkel N; Blaß J; Rogers PD; Morschhauser J. 2008. Mutations in the multi-drug resistance regulator *MRR1*, followed by loss of heterozygosity, are the main cause of *MDR1* overexpression in fluconazole-resistant *Candida albicans* strains. *Molecular Microbiology* 69:827-840.

Ergon MC; Gulay Z. 2005. Molecular epidemiology of *Candida* species isolated from urine at an intensive care unit. *Mycoses* 48:126-131.

Espinel-Ingroff A. 2002. Antifungal susceptibility methods and their potential clinical relevance. *Lab Med* 33:626-631.

Espinel-Ingroff A. 2008. Mechanisms of resistance to antifungal agents: yeasts and filamentous fungi. *Rev Iberoam Micol* 25:101-106.

Ferrari S; Ischer F; Calabrese D; Posteraro B; Sanguinetti M; Fadda G; Rohde B; Bauser C; Bader O; Sanglard D. 2009. Gain of function mutations in CgPDR1 of *Candida glabrata* not only mediate antifungal resistance but also enhance virulence. *PLoS Pathog* 5(1).

Fridkin SK; Jarvis WR. 1996. Epidemiology of nosocomial fungal infections. *Clin Microbiol Rev* 9:499-511.

García-Ruíz JC. 2004. Infección fúngica invasora en pacientes inmunodeficientes. *Rev Micol Iberoam* 21:55-62.

García-Vallve S; Palau J; Romeu A. 1999. Horizontal gene transfer in glycosyl hydrolases inferred from codon usage in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *Molecular Biology and Evolution* 9:1125-1134.

Gaxiola R; de Larrinoa IF; Villalba JM; Serrano R. 1992. A novel and conserved salt-induced protein is an important determinant of salt tolerance in yeast. *EMBO Journal* 11:3157-3164.

Hajjeh RA; Sofair AN; Harrison LH; Lyon GM; Arthington-Skaggs BA; Mirza SA; Phelan M; Morgan J; Lee-Yang W; Ciblak MA; Benjamin LE; Sanza LT; Huie S; Yeo SF; Brandt ME; Warnock DW. 2004. Incidence of bloodstream infections due to *Candida* species and *in vitro* susceptibilities of isolates collected from 1998 to 2000 in a population-based active surveillance program. JCM 42:1519-1527.

Henriques M; Azeredo J; Oliveira R. 2006. *Candida* species adhesion to oral epithelium: factors involved and experimental methodology used. Critical Reviews in Microbiology 32:217-226.

Hernández Hernández F; Córdoba Martínez E; Manzano Galloso P; López Alvarez R; Bazán Mora E; López Martínez R. 2003. Frecuencia de micosis en pacientes inmunosuprimidos de un hospital regional de la Ciudad de México. Salud Pública Mex 45:455-460.

Hiller D; Sanglard D; Morshhauser J. 2006. Overexpression of the *MDR1* gene is sufficient to confer increased resistance to toxic compounds in *Candida albicans*. Antimicrob Agents Chemother 50:1365-1371.

Holmes AR; Lin YH; Niimi K; Lamping E; Kenuya M; Niimi M; Tanabe K; Monk BC; Cannon RD. 2008. ABC transporter Cdr1p contributes more than Cdr2p does to fluconazole efflux in fluconazole-resistant *Candida albicans* clinical isolates. Antimicrob Agents Chemother 52:3851-3862.

Kavanagh D. 2005. Fungi. Biology and Applications. John Wiley & Sons, Ltd. pp 176-183.

Larone DH. 2002. Medically Important Fungi: a Guide to Identification, 4a ed. ASM Press. p 113.

Larriba G; Rubio Coque J; Ciudad A; Andaluz E. 2000. *Candida albicans* molecular biology reaches its maturity. Internatl Microbiol 3:247-252.

Lian C; Zhao J; Zhang Z; Liu W. 2004. Genotype of *Candida* species associated with different conditions of vulvovaginal candidosis. Mycoses 47:495-505.

Lumbreras C; Lizasoain M; Aguado JM. 2003. Antifúngicos de uso sistémico. Enferm Infecc Microbiol Clin 21(7): 366-80.

Marol S; Yucesoy M. 2007. Molecular epidemiology of *Candida* species isolated from clinical specimens of intensive care unit patients. Mycoses 51:40-49.

Martínez Fernández CA; Carnot Uría J; de Castro Arenas R; Muñío Perurera J; Torres Iribar W. 1998. Tratamiento de las micosis profundas. Estado actual. Acta Medica 8 (1): 80-5.

Mellado E; Cuenca Estrella M; Rodríguez Tudela JL. 2002. Clinical relevance of mechanisms of antifungal drug resistance in filamentous fungi. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 20:523-9.

Messer SA; Jones RN; Fritsche TR. 2006. International Surveillance of *Candida* spp. and *Aspergillus* spp.: Report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2003). *J Clin Microbiol* 44:1782-1787.

Niimi M; Niimi K; Takano Y; Holmes AR; Fischer FJ; Uehara Y; Cannon RD. 2004. Regulated overexpression of *CDR1* in *Candida albicans* confers multidrug resistance. *J Antimicrobial Chemotherapy* 54:999-1006.

Odds FC. 1988. Ecology and epidemiology of candidiasis. In: *Candida and Candidosis*. Leicester University Press: Baltimore. p 89.

Olive DM; Bean P. 1999. Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. *J Clin Microbiol* 37:1661-1669.

Pfaller MA; Diekema DJ; Gibbs DL; Newell VA; Meis JF; Gould IM; Fu W; Colombo AL; Rodríguez-Noriega E; and the Global Antifungal Surveillance Group. 2007. Results from the ARTEMIS DISK global antifungal surveillance study, 1997 to 2005: and 8.5-year analysis of susceptibilities of *Candida* species and other yeast species to fluconazole and voriconazole determined by CLSI standardized disk diffusion testing. *J Clin Microbiol* 45:1735-1745.

Pfaller MA; Diekema DJ; Gibbs DL; Newell VA; Ng KP; Colombo A; Finkelievich J; Barnes R; Wadula J and the Global Antifungal Surveillance Group. 2008. Geographic and temporal trends in isolation and antifungal susceptibility of *Candida parapsilosis*: a global assessment from the ARTEMIS DISK antifungal surveillance program, 2001 to 2005. *J Clin Microbiol* 46:842-849.

Regezi J; Sciubba J. 1995. *Patologia bucal*. 2ed. Mc Graw-Hill: México, pp 126-127

Ruhnke M; Hartwig K; Kofla G. 2008. New options for treatment of candidaemia in critically ill patients. *Clin Microbiol Infect* 14:46-54.

Sambrook J; Russell. 2001. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor, N.Y. pp. 6.31-6.33.

Sandhu G; Kline BC; Stockman L; Roberts GD. 1995. Molecular probes for diagnosis of fungal infections. *J Clin Microbiol* 33:2913-2919.

Sanguinetti M; Posteraro B; Fiori B; Ranno S; Torelli R; Fadda G. 2005. Mechanisms of azole resistance in clinical isolates of *Candida glabrata* collected during a hospital survey of antifungal resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 49:668-679.

Savelkoul PHM; Aarts HJM; de Haas J; Dijkshoorn L; Duim B; Otsen M; Rademaker JLW; Schouls L; Lenstra JA. 1999. Amplified-fragment length polymorphism analysis: the state of an art. J Clin Microbiol 37:3083-3091.

St-Germain G; Laverdiere M; Pelletier R; Rene P; Bourgault AM; Lemieux C; Libman M. 2008. Epidemiology and antifungal susceptibility of bloodstream *Candida* isolates in Quebec: Report on 453 cases between 2003 and 2005. Can J Infect Dis Med Microbiol 19:55-62.

Tavanti A; Hensgens LAM; Ghelardi E; Campa M; Senesi S. 2007. Genotyping of *Candida* orthopsilosis clinical isolates by amplification fragment length polymorphism reveals genetic diversity among independent isolates and strain maintenance within patients. J Clin Microbiol 45:1455-1462.

Thanos M; Schonian G; Meyer W; Schweynoch C; Graser Y; Mitchell TG; Presber W; Tietz HJ. 1996. Rapid identification of *Candida* species by DNA fingerprinting with PCR. J Clin Microbiol 34:615-621.

Torres NA; Alvarez CA; Rondon MA. 2009. Evaluación mediante tres técnicas de susceptibilidad a fluconazol en especies de *Candida* aisladas en pacientes con infecciones invasoras. Rev Chil Infect 26:135-143.

Trofa D; Gácsér A; Nosanchuk JD. 2008. *Candida parapsilosis*, an emerging fungal pathogen. Clin Microbiol Rev 21:606-625.

Tsao S; Rahkhoodae F; Raymond M. 2009. Relative contribution of the *Candida albicans* ABC transporters Cdr1p and Cdr2p to clinical azole resistance. Antimicrob Agents Chemother 53:1344-1352.

Vos P; Hogers R; Bleeker M; Reijans M; van de Lee T; Hornes M; Frijters A; Pot J; Peleman J; Kuiper M; Zabeau M. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. Nucleic Acids Research 23:4407-4414.

White TC; Marr KA; Bowden RA. 1998. Clinical, cellular, and molecular factors that contribute to antifungal drug resistance. Clin Microbiol Rev 11:382-402.

White TC; Holleman S; Dy F; Mirels LF; Stevens DA. 2002. Resistance mechanisms in clinical isolates of *Candida albicans*. Antimicrob Agents Chemother 46:1704-1713.